

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología Humana



**TERAPIAS NEUROTÓFICAS EN MODELOS DE
PARKINSONISMO EN OREDORES Y PRIMATES NO
HUMANOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Rojo Sebastián

Bajo la dirección del doctor:
J. García de Yébenes

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2080-3

T 25070



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314019623

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA HUMANA**

**TERAPIAS NEUROTROFICAS EN MODELOS DE
PARKINSONISMO EN ROEDORES Y PRIMATES NO HUMANOS.**

ANA ROJO SEBASTIÁN

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR: J. García de Yébenes

(PROGRAMA: NEUROCIENCIAS)

Madrid, diciembre 2000.



BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Al director de la tesis, Justo García de Yébenes, quien no sólo me ha intentado transmitir su gran conocimiento sino su amor por la neurología, su incesante ansia por conocer y su elogiabile y envidiable aptitud científica. Muchas gracias por haber confiado y haberme dado la oportunidad de formarme a tu lado.

A M^a Angeles Mena por compartir su alegre inteligencia y sabiduria.

A todo el personal del animalario que trabajando duro y con ilusión hicieron tanto por una perfecta novata.

A Asun por su carácter y amistad.

A Isabel y Alberto por su trabajo y tolerancia.

A mis compañeras de fatigas Aurora, Berta, Charo, Nati y a todas las personas que he conocido en mis años en la Fundación Jiménez Díaz y que siempre me apoyaron.

A mis hombres. A Gabriel y Diego a quienes he robado tiempo y atención. A Joaquín compañero de alma también en los momentos de trabajo.

Y sobre todo a mis padres, que me han enseñado a conocer y a elegir, que me han querido, que se esforzaron por que consiguiera todo lo que ahora tengo y a los que siempre he tenido a mi lado.

Son tantas las personas y tan grande su apoyo a lo largo de mi vida que me parecen ínfimas estas palabras y poco merecedor el presente trabajo, pero espero saber siempre mantener y transmitir este sentimiento de gratitud.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
A. Enfermedad de Parkinson	1
A.1. Clínica	1
A.2. Neuropatología y neuroquímica.....	2
A.3. Epidemiología. Factores de riesgo	3
A.4. Etiopatogenia	4
A.5. Tratamiento	6
B. Modelos experimentales de parkinsonismo en roedores y primates	9
B.1. Generalidades	9
B.2. Parkinsonismo inducido por 6-OHDA.....	13
B.3. Parkinsonismo inducido por MPTP	15
B.3.a. Generalidades	15
B.3.b. Neuropatología; Susceptibilidad neuronal al MPTP ...	16
B.3.c. Neuroquímica	18
B.3.d. Efectos en distintas especies	19
B.3.e. Mecanismos de acción del MPTP	20
C. Factores neurotróficos	25
C.1. Definición y evolución histórica.....	25
C.2. Clasificación y receptores.....	26
C.3. Mecanismos de actuación	30
C.4. Modificaciones fisiológicas, patológicas y experimentales de los factores neurotróficos	31
C.5. Neuroprotección y neurorestauración	32
C.6. Vías de administración	34
C.7. Factores tróficos dopaminérgicos	35
C.7.a. Generalidades	35
C.7.b. Estudios in vitro	37
C.7.c. GDNF	39
Efecto trófico dopaminérgico en roedores	40
Efecto trófico dopaminérgico en primates	45
C.7.d. FGF	46
Efecto trófico dopaminérgico en roedores	48
Efecto trófico dopaminérgico en primates	51
C.7.e. Medio condicionado por glía (MCG)	51
C.7.f. Otros factores dopaminérgicos	53
C.8. Factores neurotróficos en otras alteraciones del sistema nervioso	61
D. Métodos de evaluación de la evolución de la enfermedad de Parkinson	61

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	67
III. MÉTODOS	69
A. <i>Experimento 1. Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OH-DA en ratas</i>	69
A.1. Cirugía estereotáxica; manejo de animales; lesión con 6-OHDA	69
A.2. Medida de la rotación	70
A.3. Implantación del catéter e infusión.....	70
A.4. Prevención de la toxicidad por 6 OHDA.....	72
A.5. Preparación del MCG y medio definido (MD).....	72
A.6. Estudio neuroquímico de monoaminas en regiones cerebrales.....	73
A.7. Análisis de los resultados	75
B. <i>Experimento 2. Estudio de la tolerancia y eficacia de la infusión de FGF y GDNF en monos con hemiparkinsonismo inducido por MPTP</i>	76
B.1. Generalidades	76
B.2. Evaluación clínica.....	78
B.3. Inyección intracarotídea de MPTP	83
B.4. Colocación del catéter e infusión de factores/vehículo.....	84
B.5. Estudio neuroquímico.....	88
B.6. Estudio radiológico funcional: PET con 18F-DOPA	88
B.7. Evaluación histológica.....	89
B.8. Análisis de resultados	90
IV. RESULTADOS	92
A. <i>Experimento 1. Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OH-DA en ratas</i>	92
A.1. Efecto del MCG en la recuperación tras lesión establecida por 6-OH-DA	92
A.1.a. Efecto del MCG sobre peso y mortalidad	92
A.1.b. Efecto del MCG en la recuperación de niveles cerebrales de monoaminas	93
A.1.c. Efecto del MCG en la rotación inducida por apomorfina	95
A.2. Efecto preventivo del MCG frente a la toxicidad por 6-OH-DA ..	96
A.2.a. Efecto del MCG sobre los niveles de monoaminas cerebrales	96
A.2.b. Efecto del MCG sobre peso, mortalidad y rotación inducida por apomorfina	98

B. <u>Experimento 2.</u> Estudio de la tolerancia y eficacia de la infusión de FGF y GDNF en monos con hemiparkinsonismo inducido por MPTP	99
B.1. Descripción del modelo animal	99
B.1.a. Características clínicas	99
B.1.b. Características radiológico-funcionales	103
B.1.c. Características neuroquímicas	105
B.2. Respuesta a la infusión de factores tróficos/vehículo	106
B.2.a. Efectos clínicos	106
B.2.b. Efectos sobre la evolución en el PET	110
B.2.c. Efectos neuroquímicos	112
B.2.d. Efectos morfológicos	113
V. DISCUSION	117
A. <u>Experimento 1.</u> Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OH-DA en ratas	117
B. <u>Experimento 2.</u> Estudio de la tolerancia y eficacia de la infusión de FGF y GDNF en monos con hemiparkinsonismo inducido por MPTP	120
B.1. Caracterización del modelo animal	120
B.2. Respuesta a la infusión de factores tróficos	126
B.3. Complicaciones del procedimiento	132
VI. CONCLUSIONES	135
VII. BIBLIOGRAFÍA	136

I. INTRODUCCION

A. *Enfermedad de Parkinson*

En 1817, James Parkinson describió de forma detallada las características clínicas de una serie de seis enfermos con un trastorno por él denominado "parálisis agitante", término que intentaba combinar dos características de la enfermedad: pobreza de movimientos voluntarios y la presencia de temblor. Precisó entre sus observaciones la evolución asimétrica, el curso progresivo de la enfermedad y la marcha festinante de aparición tardía. Trousseau, en 1861, desarrolló el concepto de rigidez, definió el término bradicinesia para referirse a la lentitud característica y observó que en fases avanzadas de la enfermedad aparecía deterioro cognitivo. Otro neurólogo francés, Charcot, fue quien la denominó enfermedad de Parkinson y completó la definición de los signos clínicos. La primera evidencia del trastorno dopaminérgico asociado data de 1960 (Ehringer y Hornykiewicz).

A.1. Clínica

Desde un punto de vista simplificado se define la enfermedad de Parkinson (EP) como a un trastorno del movimiento caracterizado fundamentalmente por acinesia, rigidez, temblor en reposo y alteración de los reflejos posturales, es decir, una enfermedad caracterizada por trastornos motores. Pero en la EP aparecen otros síntomas, muchos de ellos con gran impacto en la calidad de vida, como trastornos emocionales (depresión, ansiedad), sensitivos (acatisia, dolor, piernas inquietas), alteraciones del sueño (insomnio, movimientos periódicos durante el sueño, piernas inquietas, parasomnias), trastornos gastrointestinales (sialorrea, disfagia, estreñimiento), deterioro cognitivo, trastornos autonómicos (cambios en la libido, hipotensión ortostática, sudoración excesiva, seborrea).

La EP es un cuadro de carácter progresivo que, sin tratamiento, produce un acortamiento de la esperanza media de vida. Se calcula una evolución media de 20 años desde el diagnóstico. En la fase inicial muchas veces los pacientes no reconocen los síntomas y signos pero con el paso del tiempo se muestran incapacitados y requieren medicación. De manera general la respuesta a cualquier tratamiento es inicialmente buena, de larga duración, sin fluctuaciones y sin complicaciones pero progresivamente

la mejoría sintomática es insuficiente, de perfil temporal limitado y asociada a efectos secundarios.

A.2. Neuropatología y neuroquímica

Frederich Lewy describió en 1912 los cuerpos que posteriormente fueron denominados con su apellido en diferentes núcleos subcorticales. Tretiakoff en 1919 describió su presencia en la sustancia nigra pars compacta y la atrofia de esta estructura como característica de la EP. Estas inclusiones eosinofílicas citoplásmicas tienen un núcleo central más denso y un halo periférico. El constituyente fundamental son neurofilamentos que han sufrido transformaciones por fosforilación, ubiquitinación, proteólisis y entrecruzamiento. Se tiñen con eosina y con anticuerpos contra la ubiquitina y también son inmunoreactivos a la α -synucleína (Takeda y cols., 1998). No son patognomónicos de la EP, pero cuando son abundantes y localizados en las estructuras apropiadas son unos de los marcadores histológicos más fiables. La enfermedad de Parkinson se caracteriza también por una serie de cambios morfológicos en los ganglios basales, siendo el más relevante la pérdida de neuronas dopaminérgicas que proyectan desde la sustancia nigra pars compacta (SNpc) al estriado, lo que se asocia a una disminución de los niveles de enzimas de síntesis de dopamina (DA) y a una pérdida de marcadores presinápticos dopaminérgicos. El estriado, compuesto de caudado, putamen y núcleo accumbens, recibe aferencias desde todo el córtex y desde núcleos talámicos (parafascicular y centromediano) y es el principal núcleo de salida de información desde los ganglios basales. Pero otras formaciones pigmentarias del tronco cerebral están también afectas (locus coeruleus y núcleo dorsal del vago) así como otras estructuras como los núcleos grises de la base, en particular, el pálido. Esta muerte neuronal, progresiva y de etiopatogenia desconocida, provoca una disminución paulatina de los niveles de DA en estriado, lo que produce un desequilibrio funcional en los circuitos neuroquímicos cerebrales con el consiguiente desarrollo de los signos y síntomas típicos de esta enfermedad, fundamentalmente rigidez y acinesia. Inicialmente, con una pérdida de DA estriatal de un 80%, únicamente se aprecia sintomatología leve, pero con una pérdida de DA del 95% la acinesia es ya evidente (Bernheimer y cols., 1973). Esto sugiere que durante la fase preclínica de la enfermedad se ponen en marcha una serie de mecanismos compensatorios en las neuronas supervivientes. Así pues se evidencia un incremento en la cantidad de DA liberada por cada neurona

(medido a través de un incremento en el cociente homovanílico (uno de sus metabolitos) / dopamina que puede deberse, al menos en parte, a una mayor actividad de la enzima limitante de su síntesis, la tirosina hidroxilasa (TH). Aunque la cantidad de proteína TH y la actividad total están disminuidas tanto en SN como en estriado debido a la pérdida neuronal, la actividad homoespecífica (actividad por miligramo de proteína) está incrementada (Mogi y cols., 1988). Sin embargo en cerebros de parkinsonianos la cantidad de mRNA de TH por neurona está disminuida (Javoy-Agid y cols., 1990). El aumento de la actividad TH a pesar de la disminución de niveles de proteína posiblemente se debe a cambios post-transduccionales. En modelos en ratas hemiparkinsonizadas mediante 6-hidroxidopamina (6-OHDA) se ha visto también un incremento de actividad TH en las neuronas supervivientes, que es proporcional a la deplección de DA (Hefti y cols., 1990).

Aunque el déficit dopaminérgico nigroestriatal es el característico de la enfermedad, el más intenso y el que se correlaciona con los datos clínicos, otras neuronas dopaminérgicas como las del área tegmental también degeneran (sistema mesolímbico/mesocortical) (Germain y cols., 1989). Las neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato del hipotálamo que forman el sistema tuberoinfundibular regulador de la secreción pituitaria no degeneran en la EP (Matzuk y Saper, 1985). También hay destrucción de otros grupos neurales incluyendo noradrenérgicos (pérdida de neuronas del locus coeruleus, niveles disminuidos de noradrenalina, de sus metabolitos y de las enzimas de síntesis) y serotoninérgicos (degeneración de neuronas del núcleo del rafe, disminución de serotonina y sus metabolitos) (Asberg y cols., 1984, Paulus y Jellinger, 1991). En la EP también hay degeneración de sistemas colinérgicos: disminución de acetil colina y de su enzima de síntesis a nivel cortical. Las neuronas colinérgicas estriatales intervienen en el control motor y las del prosencéfalo basal y sustancia innominada proyectan a regiones neocorticales, hipocampo y córtex entorrinal y están imbricadas en procesos mnésicos (Jellinger, 1986).

A.3. Epidemiología. Factores de riesgo

La enfermedad de Parkinson es el trastorno del movimiento más frecuente tras el temblor esencial. La diversidad de las cifras publicadas de incidencia y prevalencia en los diversos estudios obedecen a la disparidad de criterios diagnósticos, población

analizada y metodología empleada. Se calcula una prevalencia desde 18 a 187 casos por 100.000 habitantes (media 110) y una incidencia anual, por 100.000 habitantes, de 4.5-53 (media 12) (Tanner y cols., 1997), aunque, con el envejecimiento poblacional progresivo, estas cifras actualmente ya serán mayores. Martí-Masso y cols. en 1992, mediante cuestionario, cifraron la prevalencia en 1.110 casos por 100.000 habitantes mayores de 65 años. El último estudio europeo, en el que se incluyen datos españoles, cifra la prevalencia en 1.600 casos por 100.000 habitantes mayores de 65 años (De Rijk y cols., 1997).

El incremento de prevalencia de la EP y de cambios histopatológicos en el sistema nigroestriado con la edad hacen considerar el envejecimiento como un factor de riesgo para la EP. El descubrimiento de parkinsonismo por la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en humanos (Langston y cols., 1983) y de la relación del aminoácido excitador beta-N-metilamino-alanina, presente en la planta *Cycad circinalis*, en la etiología del complejo parkinson-ELA-demencia (Spencer y cols., 1987) estimuló la búsqueda de tóxicos ambientales en la etiología de la EP. Varios estudios describieron como factores de riesgo la residencia en zonas rurales, la exposición a herbicidas, el consumo de agua de pozo, la exposición a derivados de gasolina y otros productos industriales, las dietas pobres en vitamina E y ácido ascórbico o ricas en capsaicina, pero estudios epidemiológicos realizados al efecto descartaron esta asociación. Se ha definido también una asociación negativa entre hábito tabáquico y EP (Baumann y cols., 1980; Jiménez-Jiménez y cols., 1992; Tanner y cols., 1990) que puede deberse a un efecto neuroprotector del tabaco, a una mayor mortalidad en los fumadores o bien a una menor tendencia adictiva en pacientes afectados de EP, secundaria a la disminución de activación de receptores nicotínicos situados en neuronas mesolímbicas que controlan los mecanismos de adicción.

A.4. Etiopatogenia

La etiología de la enfermedad de Parkinson continúa siendo desconocida. Se conocen factores ambientales y genéticos y se han postulado distintos mecanismos patogénicos: alteración en la producción energética (déficit del complejo I mitocondrial (Schapira y cols., 1989 y 1990; Mizuno y cols., 1989 y 1990), daño mediado por

radicales libres (Cohen, 1987; Jenner y *cols.*, 1992; Beal, 1995), excitotoxicidad, inducción de apoptosis.

El descubrimiento de alteraciones de la función mitocondrial, del metabolismo del hierro, de un aumento de la peroxidación lipídica y de actividades menores de enzimas que intervienen en “mecanismos antioxidación” sugieren que un incremento del estrés oxidativo y el consiguiente exceso en la producción de radicales libres podrían ser mecanismos patogénicos relevantes en la EP. La autooxidación y la oxidación deaminativa de la DA produce radicales libres potencialmente tóxicos por lo que el tratamiento con su precursor, la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), podría favorecer la degeneración y muerte neuronal.

Las fibras que proyectan desde la corteza al estriado y desde el núcleo subtalámico al pálido medial usan el glutamato como principal neurotransmisor. El déficit dopaminérgico podría conducir a una desinhibición de la actividad glutamatérgica y a lesión excitotóxica, mediada por aumento de calcio intracelular y activación de lipasas, proteasa y endonucleasas. También se ha descrito una disminución de proteínas ligadoras de calcio en sustancia nigra de pacientes con EP (Iacopino y Christakos, 1990). Los inhibidores de la enzima de síntesis del óxido nítrico protegen contra la neurotoxicidad del MPTP (Przedborski y *cols.*, 1992) por lo que se ha implicado esta sustancia en la degeneración a través de mediación en mecanismos de excitotoxicidad, liberación de hierro y radicales libres e inducción de lesión en complejo I mitocondrial. Otros mecanismos implicados son déficit de factores neurotróficos como el derivado de fibroblastos (FGF) (Tooyama y *cols.*, 1993) y daño mediado por citoquinas, como el factor del necrosis tumoral alfa, producido por células gliales activadas. Como se ha descrito, muchos de estos mecanismos pueden estar imbricados y es difícil establecer cuál es el primario: las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra están sometidas a un elevado estrés oxidativo secundario al metabolismo de las catecolaminas, lo que junto a un defecto en la producción de energía puede desencadenar la muerte neuronal tanto por activación de apoptosis como por necrosis mediada a través de excitotoxicidad.

Recientemente han sido identificadas alteraciones genéticas en pacientes con EP. En 1996, Polymeropoulos y *cols.*, al realizar análisis de ligamiento en una familia con EP de origen italiano con 7 individuos afectados, localizaron en la región 4q21-q23 el primer locus asociado a esta patología. El análisis molecular definió al gen que codifica

para la proteína α -synucleína (*SNCA*) como el factor genético candidato asociado a la EP. La secuenciación del exón 4 de *SNCA* reveló la transición guanina→alanina en la posición 209 del cDNA, que resultaría en la sustitución de la alanina 53 por treonina en la cadena aminoacídica de la proteína y en la creación de una nueva diana de restricción para el enzima *Tsp45* en el DNA (Polymeropoulos y cols., 1997). Posteriormente, Kruger y cols. identificaron, en una familia de origen alemán, una nueva mutación en *SNCA* que consiste en la transversión guanina→citosina en la posición nucleotídica 88 de la secuencia codificante. Esta mutación causaría la sustitución de la alanina en posición 30 de la α -synucleína por prolina, además de generar una nueva diana en el DNA para el enzima de restricción *MvaI*. Sin embargo, el análisis molecular de numerosas familias afectas, por diferentes grupos de investigación, ha revelado la ausencia de ligamiento al cromosoma 4q21-23. Poco después, Gasser y cols. localizaron un segundo locus asociado a EP en el cromosoma 2p13. El gen asociado, aun sin identificar, está en la zona alfa de TGF, un gen cuya anulación produce el trastorno de la diferenciación de células embrionarias de la sustancia nigra. Recientemente, Leroy y cols. estudiaron, en pacientes con EP provenientes de 72 familias, el gen que codifica para la enzima ubiquitina-carboxilo-terminal-hidrolasa-1 (*UCH-L1*), enzima que interviene en la ruta metabólica de proteólisis dependiente de ubiquitinas y presente en los cuerpos de Lewy. En sólo una de las familias se detectó una mutación puntual. Al igual que en el caso de la α -synucleína, parece que las mutaciones que ocasionan cambios en la enzima *UCH-L1*, intervienen sólo en una minoría de pacientes con la forma familiar de la enfermedad. También se ha identificado en el parkinsonismo juvenil recesivo la asociación con mutaciones en un gen (*PARKIN*) localizado en la región 6q25.2-q27 (Matsumine y cols., 1997) que codifica para una proteína cuya función está todavía por determinar.

A.5. Tratamiento

En cuanto al tratamiento, inicialmente se emplearon anticolinérgicos naturales (atropina, hioscina) y más tarde sintéticos, con un efecto fundamentalmente antitremórico. En los años 50 se identificó la dopamina como neurotransmisor y se comprobó que la administración de un precursor capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, la L-DOPA, mejoraba la acinesia producida por reserpina en ratones

(Carlsson y cols., 1957). Se identificó como una característica de la enfermedad una severa reducción de dopamina en el cuerpo estriado de los pacientes con enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1966) y a principios de los sesenta, Birkmayer en Viena y Barbeau en Canadá, iniciaron el tratamiento substitutivo con L-DOPA. Unos años más tarde se identificó la vía nigroestriatal (Andén y cols., 1966) pudiéndose entonces relacionar la pérdida neuronal en la sustancia nigra compacta con la disminución de dopamina en el estriado. La mejoría de la mayoría de los síntomas parkinsonianos tras la administración de L-DOPA confirmó que la enfermedad es el resultado de la deficiencia de dopamina en el estriado (Cotzias y cols., 1967, 1969). La vida media de la L-DOPA en plasma es corta, pero si la enfermedad no está muy avanzada el paciente todavía posee neuronas dopaminérgicas con terminales que pueden captar selectivamente el neurotransmisor y liberarlo según el estímulo nervioso. Con la progresión de la degeneración la capacidad de almacenamiento de L-DOPA va disminuyendo, la respuesta es cada vez más insuficiente y menos predecible. Otros problemas que plantea este tratamiento son frecuentes efectos secundarios e interferencias farmacocinéticas, como con proteínas de la dieta. Posteriormente se comercializaron formulaciones de liberación prolongada con el propósito de mantener unos niveles estables de L-DOPA en plasma que permitieran obtener una respuesta terapéutica de mayor duración, pero con menor efectividad en muchos casos. Con el fin de aumentar la vida media de la L-DOPA e incrementar su período de efectividad se encuentran en el mercado unos nuevos fármacos, los inhibidores de la catecol-orto-metil transferasa (COMT), enzima que interviene en la degradación de la L-DOPA. Otra estrategia terapéutica en la EP la constituyen los agonistas dopaminomiméticos. Son fármacos sintéticos que actúan sobre alguno o algunos de los receptores de dopamina. Actualmente están comercializados apomorfina, bromocriptina, lisuride, pergolide, pramipexole y ropinirole. Tienen una cinética mucho más sencilla que la de la L-DOPA (su absorción no depende de proteínas, no sufren un metabolismo periférico tan importante, no requieren recaptación, almacenamiento, decarboxilación y liberación por la terminal presináptica como la L-DOPA), pero la eficacia terapéutica sintomática de los agonistas dopaminomiméticos es, a dosis habituales, muy inferior a la de la L-DOPA. Estos compuestos presentan grandes diferencias entre ellos en lo que se refiere a estructura química, tipos de receptores sobre los que ejercen su efecto farmacológico y propiedades cinéticas. Los efectos secundarios gastrointestinales, cardiovasculares y mentales son mucho más

frecuentes que con la L-DOPA; por el contrario, los efectos secundarios motores, como discinesias y fluctuaciones, mucho más raros con los agonistas. Otros fármacos empleados en la EP son inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO), otra enzima que interviene en el catabolismo de la L-DOPA, aumentando su biodisponibilidad, como la selegilina (también conocida como deprenil). El efecto sintomático es de muy larga duración y puede ser debido a la inhibición de la MAO, de carácter irreversible y con una duración de varias semanas, o a la producción del metabolito intermediario metanfetamina. Además de esta acción aparecieron datos que sugerían que la selegilina frenaba el proceso de envejecimiento en ratas, la progresión de la EP y la muerte en pacientes parkinsonianos o la producción de radicales libres en cerebro de pacientes parkinsonianos (Knoll y cols., 1983; Birkmayer y cols., 1985; Riederer y cols., 1986). Estudios posteriores, en los que se controló el efecto sintomático mediante supresión de la medicación durante varias semanas, confirmaron el efecto neuroprotector de la selegilina (Olanow y cols., 1996; Koller, 1997; Olanow, 1997; Myllyla y cols., 1997). Inicialmente se atribuyó el efecto neuroprotector a la inhibición de la MAO y, por tanto, a la disminución de producción de radicales libres, pero no hay evidencia de que ésta sea responsable de ese efecto. De hecho, estudios in vitro en células de neuroblastoma humano ricas en dopamina han revelado que la pargilina, un inhibidor no selectivo de las MAO A y B, no ejerce papel neuroprotector (Mena y cols, estudios sin publicar). Hay evidencias de que selegilina tiene un papel antioxidante indirecto a través de la inducción de enzimas que intervienen en la eliminación de radicales libres como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Carrillo y cols., 1991). Recientemente se ha demostrado que la selegilina juega un papel neuroprotector en neuronas del núcleo facial lesionadas mediante axotomía, un sistema en el que la MAO no juega un papel relevante. Este fármaco promueve la secreción de factores neurotróficos como el CNTF (Tatton y cols., 1996) y favorece la oclusión del poro de alta permeabilidad de la membrana mitocondrial, estructura cuya apertura juega un papel muy importante en el inicio de la apoptosis (Tatton y cols., 1997). Se ha descrito un aumento de muertes cardiovasculares en pacientes tratados con deprenil y también puede producir insomnio, excitación y cuadros psicóticos sobre todo en pacientes ancianos.

Finalmente existen otros tratamientos de efectividad más limitada, como el amantadine, fármaco con efectos inhibidores de la transmisión excitatoria, pero es poco potente, tiene efectos secundarios parecidos a los anticolinérgicos y tolerancia

farmacológica, de modo que en la mayoría de los casos el efecto terapéutico desaparece a los 6 meses del inicio.

Así pues, la enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada de forma esquemática por la progresiva muerte de un grupo neuronal (las neuronas nigroestriatales dopaminérgicas) y por el consiguiente déficit de dopamina, siendo la primera de estas enfermedades en la que la sustitución del neurotransmisor deficitario restablece la función y produce una mejoría sintomática. Pero pese a múltiples tratamientos sintomáticos eficaces no hay un tratamiento que frene de manera evidente la progresión de la enfermedad y, con ella, la falta de respuesta adecuada a los tratamientos referidos, llegando los pacientes, en las fases finales, a graves limitaciones funcionales. Es una enfermedad frecuente en la población y de un impacto socioeconómico importante. Por todo lo referido, es necesario la investigación en estrategias terapéuticas que puedan cambiar la evolución del trastorno.

B. Modelos experimentales de parkinsonismo en roedores y primates.

B.1. Generalidades

La enfermedad de Parkinson está definida por criterios clínicos, morfológicos y neuroquímicos y, en base a éstos, se han desarrollado los modelos experimentales y se definen las posibles respuestas esperadas ante estrategias terapéuticas. En la [Tabla 1](#) se resumen los mecanismos de actuación y utilidad de distintos fármacos y neurotoxinas empleadas a lo largo del tiempo en el desarrollo de modelos experimentales de parkinsonismo. Fármacos que reduzcan o inhiban la síntesis o liberación de dopamina estriatal podrían, teóricamente, reproducir las alteraciones clínicas de la EP sin producir una lesión estructural de la SNpc. La reserpina ha sido el modelo farmacológico más utilizado: administrada de forma sistémica produce una deplección de monoaminas en el sistema nervioso central al inhibir su almacenamiento sináptico. El animal presenta un estado de catalepsia y rigidez reversible con agonistas dopaminomiméticos, por lo que ha servido para evaluar la efectividad de distintos tratamientos y el efecto que produce la pérdida de aporte de dopamina sobre el estriado, aunque no existen las alteraciones histológicas características de la enfermedad.

Tabla 1. Modelos experimentales de lesión dopaminérgica en roedores y primates.

	Perfil temporal	Especie	Selectividad neuronal	Acción	Utilidad
Reserpina	Agudo y crónico	Roedores y primates	DA, NA, 5-HT	Deplección progresiva	Fármacos sintomáticos
Haloperidol y otros neurolépticos	Agudo y crónico	Roedores y primates	DA, NA, 5-HT	Bloqueo del receptor	Fármacos sintomáticos
6-OHDA	Agudo	Roedores	NA, DA	Deplección, muerte neuronal	Fármacos sintomáticos, protectores / restauradores
Metanfetamina	Agudo	Roedores	NA, DA, 5-HT, GABA, glutamato	Inhibición de MAO, análogos tóxicos de NT	Fármacos sintomáticos, protectores / restauradores
MPTP	Agudo y crónico	Roedores y primates	NA, DA, 5-HT, neuropéptidos	(ver Tabla 2)	Fármacos sintomáticos, protectores / restauradores
Axotomía	Agudo y crónico	Roedores	variable	variable	Variable
α-metil-paratirosina	Agudo	Roedores	NA, DA	Inhibición TH	Fármacos sintomáticos
Antagonistas del calcio	Agudo y crónico	Roedores y primates	DA, 5-HT	Inhibición síntesis o liberación	Fármacos sintomáticos
Metales (Fe, Mn)	Agudo y crónico	Roedores	DA	Estrés oxidativo, inhibición enzimática	Fármacos sintomáticos

DA: dopamina; NA: noradrenalina; 5-HT: serotonina; Fe: hierro; Mn: manganeso; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Los modelos de enfermedad de Parkinson inducidos con neurotoxinas han permitido el estudio de los posibles mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, de la eficacia de distintos tratamientos tanto sintomáticos como neuroprotectores y/o neurorestauradores y de la eficacia de intervenciones quirúrgicas o transplantes, siendo siempre necesario probar eficacia y seguridad en dichos modelos previamente a la

administración en humanos. Estos modelos animales imitan la lesión neuropatológica y son excelentes modelos bioquímicos aunque, desde el punto de vista clínico, no son superponibles a la EP, en particular los modelos en roedores, y carecen de una característica fundamental que es la naturaleza progresiva de la enfermedad (Bankiewicz y cols., 1993). Un problema es la dificultad en producir una lesión homogénea y la posibilidad de recuperación espontánea, cosa que nunca ocurre en la EP. Así pues en ratón se vio que la deplección de DA en estriado y accumbens muestra una tendencia a la recuperación con el tiempo (Melamed y cols., 1986). La disminución del número de cuerpos neuronales y de fibras TH tras administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a ratón joven, es severa a los 3 días, pero a partir de este momento la densidad de terminales TH se recupera progresivamente (Mitsumoto y cols., 1998). En perros, también el síndrome extrapiramidal es reversible y en monos, el cuadro de parkinsonismo es persistente cuando se produce un hemiparkinsonismo, pero parece que hay recuperación en modelos bilaterales. Hay controversias sobre la reversibilidad del cuadro clínico en los primates hemiparkinsonizados por MPTP, en gran parte debido a la complejidad de la evaluación clínica. En estudios previos, seguidos al menos durante un año, se observó recuperación sólo en alguno de los parámetros conductuales evaluados. Los mecanismos implicados en esta recuperación espontánea son desconocidos pero pueden deberse a alteraciones transitorias de otros sistemas distintos al nigroestriatal (Jenner y cols., 1986; Luquin y cols., 1991).

En roedores, los modelos más frecuentemente empleados se logran mediante aplicación de la neurotoxina intracerebralmente, provocándose un hemiparkinsonismo contralateral, valorándose clínicamente la acinesia en extremidades contralaterales. La 6 hidroxidopamina (6-OHDA) es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos de lesión nigroestriatal en roedores. En primates humanos y subhumanos, la administración sistémica de la neurotoxina MPTP induce un cuadro semejante en aspectos neuroquímicos, neuropatológicos y comportamentales a la EP. Monos lesionados con MPTP desarrollan un síndrome caracterizado por akinesia, bradicinesia, rigidez, temblor e inestabilidad postural semejantes a la EP. Estos signos característicos de la enfermedad mejoran de forma dosis-dependiente con la administración de fármacos antiparkinsonianos. Se han empleado diversas vías de administración del MPTP (intravenoso, intraarterial, subcutáneo, intraperitoneal), con distintas dosis y pautas de administración de neurotoxina lo que, añadido a la distinta

susceptibilidad tanto interespecie como individual, hace de éste un modelo no homogéneo ni totalmente predecible.

Clínicamente también se valora de manera habitual en modelos de hemiparkinsonismo la respuesta rotatoria ante la administración de fármacos y la variación de este parámetro como respuesta a distintos tratamientos. La rotación se considera un indicador del grado de la severidad de la lesión nigroestriatal. La administración de sustancias que aumentan la liberación de DA, como la anfetamina, produce rotación ipsilateral, mientras que los agonistas dopaminérgicos como la apomorfina produce rotación contralateral. La explicación de la base patogénica de la actividad rotacional es controvertida (Barker y Dunnet, 1994). Clásicamente se acepta que la activación asimétrica del estriado es la causa de la respuesta rotatoria (Ungerstedt, 1971a, b y c). Se produce un desequilibrio en la actividad dopaminérgica entre los dos sistemas nigroestriatales que se traduce en una asimetría motora tras la administración de drogas que interfieren con la transmisión catecolaminérgica. La apomorfina es un agonista no selectivo D1 y D2 que produce una rotación contralateral en animales con lesiones nigroestriatales unilaterales. La intensidad de la rotación es proporcional a la degeneración del sistema dopaminérgico por lo que se usa como indicador del grado de lesión. Un número mayor o igual a 200 vueltas por hora, en roedores, se corresponde con una deplección de la dopamina estriatal mayor del 90% con una especificidad y un valor predictivo positivo del 100% (Hudson y cols., 1993). Por esto los test farmacológicos son empleados para realizar una aproximación al grado de lesión nigroestriada y valen para seleccionar animales, para determinado experimento, y para probar la eficacia de tratamientos. En el comportamiento rotatorio se distinguen dos componentes (Pycck, 1980): la dirección, determinada por el estriado dorsal, y el grado, condicionado por el estriado ventral. Lesiones posteriores estriatales inducen rotación ipsilateral ante apomorfina y las más anteriores, rotación contralateral. La administración en sustancia nigra de ion 1-metil-4-fenil-piridinium (MPP+), metabolito activo del MPTP, produce rotación contralateral (Lange, 1990) pero también se ha publicado aparición de rotación ipsilateral (Sun y cols., 1988) quizás por extensión del daño neurotóxico, al fascículo estrionigro descendente. El sistema corticoestriatal parece influir de forma importante en la respuesta rotatoria y quizás también el sistema mesocortical.

En el modelo 6-OHDA se produce degeneración dopaminérgica nigroestriatal pero dentro de la sustancia nigra existen subgrupos neuronales con diferente grado de expresión de TH y con distinta susceptibilidad a la 6-OHDA (siendo más sensibles a la degeneración las neuronas de mayor tamaño). En el modelo por MPTP se produce deplección de neuronas dopaminérgicas en la zona ventral de la pars compacta y pérdida celular parcial en el área tegmental ventral y en la zona medial, ventral y lateral de la SN. Existen diferencias a nivel patológico con la EP, como por ejemplo, en el modelo por MPTP en primates no humanos, la ausencia de cuerpos de Lewy, la no predominancia de la lesión en el tercio lateral de la sustancia nigra ni la presencia de mayor cantidad de neuromelanina. Además en los monos MPTP se puede apreciar un hinchamiento axonal y un material granular en neuronas supervivientes de la sustancia nigra (Forno y cols., 1986). La cuantificación de neuronas TH positivas en la sustancia nigra y la densidad de estas terminales en el estriado es una medida frecuentemente empleada del grado de degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Desde el punto de vista neuroquímico, en los modelos se evidencia una deplección de dopamina en el estriado. Igualmente se puede estudiar el estado del metabolismo de la DA evaluando actividades enzimáticas implicadas o niveles de sus metabolitos.

B.2. Parkinsonismo inducido por 6-OHDA

La 6-OHDA (2,4,5 trihidroxi fenil etilamina) fue descubierta como neurotoxina en 1968 por Thoenen y Tranzer. Ese mismo año se comprobó que administrada en parénquima cerebral destruye terminales noradrenérgicos y dopaminérgicos (Ungerstedt 1968). Presenta afinidad por los transportadores de NA y DA y es así como penetra en estas células. Este sistema de transporte es sensible a cocaína y desipramina y, cuando no están presentes estos transportadores, se pierde su selectividad y puede ser tóxico para un gran número de tipos celulares. El mazindol (bloqueante del transporte de la DA) inhibe la toxicidad sobre células dopaminérgicas. Las células noradrenérgicas tienen más sitios de unión de baja afinidad a la 6-OHDA por lo que la neurotoxicidad es mayor que sobre las células dopaminérgicas. Una vez que se encuentra en el interior de la célula, aproximadamente la mitad se sitúa en citoplasma y la otra mitad entra en las vesículas transportadoras y desplaza a la noradrenalina, por lo que inicialmente muestra un efecto simpaticomimético indirecto. Con el tiempo cambia la distribución (disminuye la fracción microsomal) y depleta de monoaminas a la célula. La 6-OHDA tiene una

toxicidad extracelular inespecífica mediada por su reactividad espontánea con el oxígeno (autooxidación), formando agua oxigenada, radicales libres tipo hidroxilo y semiquinonas, y una intracelular que, además de la producción de estos metabolitos tóxicos, incluye la modificación mediante unión covalente a proteínas como la albúmina y la inactivación de enzimas, como la COMT (Baumbarten y Zimmermann, 1992). También inhibe la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka y Youdim, 1995). El determinante de la toxicidad de la 6-OHDA es la capacidad de la célula de neutralizar radicales libres y peróxidos. El ácido ascórbico aumenta la sensibilidad a la 6-OHDA y la catalasa, vitamina E, N-Acetyl cisteína y desferrioxamina protegen de sus efectos tóxicos (Cadet y cols., 1991; Luquin y cols., 1996).

La 6-OHDA administrada por vía sistémica destruye las terminales simpáticas adrenérgicas y, a dosis altas, los cuerpos neuronales, pero carece de acción tóxica sobre el sistema nervioso central (Jonsson 1970,1976; Grahnam 1978). Inyectada en la vía nigroestriatal de ratas produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales, de sus terminales estriatales y de los niveles de DA, serotonina, encefalina y sustancia P estriatales. La degeneración neuronal afecta por igual tanto a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (A9) que proyectan al estriado como a las del área tegmental ventral (A10) que forman parte del sistema mesolímbico (Ungerstedt, 1968 y 1971a). Algunos autores, por ello, prefieren inyectarla en SNpc, evitando de esa manera la afectación de neuronas del área A10. Otra vía de administración empleada de la 6-OHDA es la intraestriatal, con el fin de producir una degeneración menos severa y más lenta y progresiva que asemeje más a la que ocurre en la EP (Przedborski y cols., 1995). La 6-OHDA administrada de forma selectiva en distintas zonas del estriado produce lesiones parciales que originan, no sólo comportamiento rotatorio mediado por fármacos, sino cambios espontáneos en función motora y sensitivo-motora, similares a los que aparecen en la EP. La degeneración parece ser debida no a transporte axonal retrógrado de la neurotoxina sino a degeneración antidrómica secundaria a la lesión de los terminales (Bjorklund y Lindvall, 1984).

La lesión unilateral por 6-OHDA induce cambios neuroquímicos y neurofisiológicos compensatorios del déficit dopaminérgico y que tardan un tiempo en establecerse. Por ejemplo, se ha descrito una inducción y activación de tirosina hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de catecolaminas) en las neuronas dopaminérgicas funcionantes (Acheson y cols., 1980), un aumento de la DA liberada en

estriado y un incremento en el número de receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos (up regulation) (Creese y cols., 1977). Este fenómeno de hipersensibilidad por denervación afecta sobre todo a los receptores estriatales D2 (Creese, 1982).

B.3. Parkinsonismo inducido por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)

B.3.a. Generalidades

El MPTP es un análogo de la meperidina que produce en humanos (Davies y cols., 1979, Langston y cols., 1983) y en animales de experimentación un síndrome parkinsoniano que se ha utilizado durante los últimos 15 años como modelo experimental de enfermedad de Parkinson caracterizado por una degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriado con severa pérdida neuronal en la sustancia nigra compacta. En 1982 se produjo una pequeña epidemia de parkinsonismo en drogadictos en el norte de California debido al consumo de heroína contaminada con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) aislándose de esa manera esa neurotoxina tan valiosa para desarrollar un modelo experimental (Langston y cols., 1983). El descubrimiento de esta neurotoxina potenció extraordinariamente la investigación sobre la enfermedad de Parkinson. Permitió el desarrollo de modelos experimentales animales, focalizándose la investigación de la etiología de esta enfermedad en factores ambientales o endógenos de acción similar al MPTP. Se caracterizó un defecto mitocondrial en pacientes EP semejante al producido por el MPTP, aunque los resultados son controvertidos (Blake y cols., 1997). Igualmente hizo pensar en un mecanismo de protección frente a la enfermedad, de neuroprotección, a través de inhibición de la monoamino oxidasa tipo B (MAO-B), enzima necesaria para que el MPTP ejerza su toxicidad.

El parkinsonismo inducido por MPTP en humanos reproduce el síndrome clínico de la enfermedad de Parkinson idiopática, aunque muchos casos se presentaron de manera aguda como un síndrome parkinsoniano severo equiparable a estadios avanzados de la enfermedad (Höehn y Yahr IV-V) y sufrieron rápidamente complicaciones de la respuesta al tratamiento con levodopa/carbidopa, -deterioro fin de dosis, discinesias pico de dosis, alucinaciones (Ballard y cols., 1985). Otras personas inicialmente asintomáticas han desarrollado la clínica con el paso del tiempo y,

mediante estudios seriados con tomografía por emisión de positrones (PET) con fluoro-DOPA, se ha comprobado que la captación disminuye con el tiempo de forma similar a la EP y que la degeneración continúa pese a que la exposición fue puntual (Vingerhoets y cols., 1994).

B.3.b. Neuropatología; Susceptibilidad neuronal al MPTP

El MPTP no reproduce completamente la lesión histológica de la enfermedad de Parkinson idiopática ya que la presencia de cuerpos de Lewy, lesión histopatológica característica de esta enfermedad, es sólo ocasional en parkinsonismo por MPTP. En el primer caso autopsiado en humanos expuestos al MPTP se describió la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la presencia de una inclusión citoplásmica eosinófila en la sustancia nigra que podría corresponder a un cuerpo de Lewy (Davies y cols., 1979). Otros pacientes expuestos al MPTP en 1982 han desarrollado un síndrome parkinsoniano 10 años más tarde y, por ese perfil temporal más similar al de la enfermedad de Parkinson idiopática, es más probable la aparición de cuerpos de Lewy (Vingerhoets y cols., 1994). Estudios histológicos en primates han demostrado que la lesión por MPTP no es selectiva de esa región dopaminérgica (Forno y cols., 1986). En primates añosos la administración de MPTP induce además degeneración de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y del locus coeruleus, donde se han descrito cuerpos de inclusión eosinofílicos semejantes a los cuerpos de Lewy (Forno y cols., 1986 y 1988; Waters y cols., 1987).

La toxicidad por MPTP no afecta por igual a todas las regiones dopaminérgicas: el sistema dopaminérgico mesolímbico (área ventral tegmental) se encuentra más preservado (Burns y cols., 1986; Campbell y cols., 1990; Takada y cols., 1991; Hung y cols., 1995). La degeneración dopaminérgica en área ventral tegmental es de menor intensidad que en la SNpc y es visible también en macacos jóvenes. MPTP tritiado administrado en estriado se acumula en las neuronas de la sustancia nigra compacta y en las neuronas del núcleo dorsal del rafe, pero respeta el área ventral tegmental (Campbell y cols., 1990). En un joven que sufrió un cuadro de parkinsonismo por MPTP, autopsiado a los 22 meses del inicio, se comprobó que el daño se encontraba confinado a la SNpc (pérdida neuronal, astrocitosis y pigmento melánico libre) (Parisi y Burns, 1986). Por ejemplo, en el tití en el que se administra MPTP intraperitoneal hay pérdida

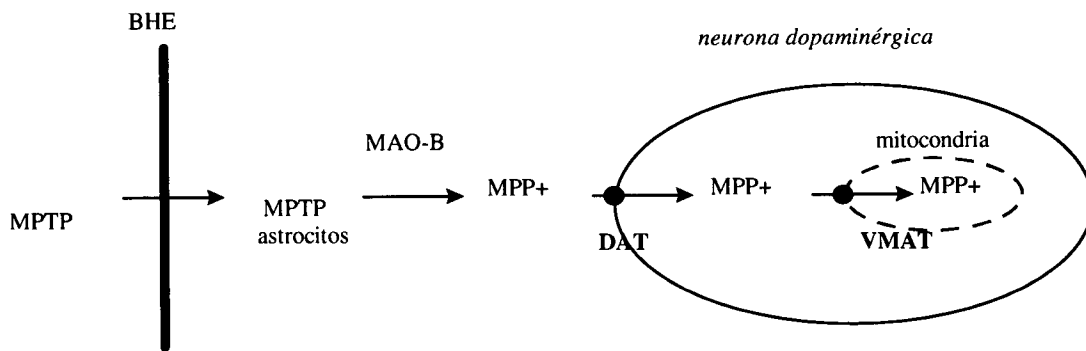
parcial de neuronas dopaminérgicas en área tegmental ventral, manteniéndose intactos el locus coeruleus y el área innominata, que degeneran en la EP. Los mecanismos de la selectividad neuronal del MPTP son desconocidos y posiblemente múltiples. Puede que la presencia y concentración de hierro y de otros metales de transición que potencian la toxicidad del MPTP+ estén implicados en las diferencias regionales en la susceptibilidad al efecto tóxico (Di Monte y cols., 1995). La concentración extracelular de ATP afecta a la velocidad y a la afinidad del transportador de dopamina y regula estas constantes en el transporte de MPP+ pudiendo modificar su toxicidad (Dunigan y Shamoo, 1996). Además, en la sustancia nigra compacta no se expresa glutathione peroxidase dependiente de selenio a diferencia del área ventral tegmental (sistema mesolímbico), lo cual podría relacionarse con su mayor vulnerabilidad a insultos que aumenten los radicales libres. También la distribución de la glía, con posible efecto neurotrófico sobre las neuronas productoras de dopamina (Hirsch y cols., 1988, Di Monte y cols., 1992, Damier y cols., 1996 Mena y cols., 1997), sugiere una mayor desprotección en la sustancia nigra compacta que en el área ventral tegmental. Recientemente, Hung y Lee (1996) han encontrado que la expresión génica de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es, en condiciones basales, mayor del doble en el sistema mesolímbico que en el mesoestriatal implicando esta diferencia en la mayor resistencia del primero a la acción neurotóxica del MPP+.

Otros experimentos en ratón C57BL/6 evidenciaron que el MPTP afecta de manera selectiva a las distintas neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en una proporción semejante a la degeneración apreciada en la EP (75% en células A9, equivalente a la SN en humanos); 69% de degeneración en células del núcleo A8; 55% en N interfasciculares; 42% en área tegmental ventral y sin evidencia de pérdida neuronal en núcleos centrales (German y cols., 1996).

El transportador de dopamina (DAT) es el utilizado por la 6-OH-DA y por el MPTP para introducirse en el citoplasma neuronal y el transportador de monoaminas vesicular (VMAT2) concentra estas neurotoxinas en las vesículas sinápticas, donde son menos tóxicas. Los niveles de DAT y VMAT2 difieren en los distintos grupos neuronales dopaminérgicos y se correlacionan con la pérdida celular en la EP (Uhl y cols., 1998). En estudios en ratones transgénicos en los que se han modificado los niveles de expresión de los transportadores se han conseguido distintos niveles de toxicidad: superexpresión de DAT en células no neurales hace que el MPP+ destruya

células previamente resistentes (Pifl y cols., 1993) y superexpresión de VMAT2 suprime la toxicidad por MPTP porque se acumula en las vesículas donde es menos reactivo (Liu y cols., 1994). En la SNpc de ratas, monos y de humanos se detecta mayor expresión de RNAm de DAT que en el área tegmental ventral y mucho menores en las neuronas del fascículo arcuato. Las neuronas nigricas que degeneran en enfermos con EP expresan mayor cantidad de DAT que las neuronas supervivientes y que controles (Uhl y cols., 1994).

Figura 1. Representación esquemática de la distribución y metabolismo del MPTP tras su administración sistémica.



BHE: barrera hematoencefálica; DAT: transportador de dopamina; MAO-B: monoaminoxidasa B; MPP+: ión 1-metil-4-fenil-piridinium; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; VMAT: transportador de monoaminas vesicular.

B.3.c. Neuroquímica

El MPTP produce unos cambios neuroquímicos semejantes a los descritos en la EP: disminución en la concentración de dopamina y sus metabolitos (ácido homovanílico y 3,4 dihidroxifenilacético), de la actividad de la enzima tirosin hidroxilasa y cambios en la densidad de receptores dopaminérgicos (Falardeau y cols., 1988; Pérez-Otaño y cols., 1991; Pifl y cols., 1992). Aunque en la EP la pérdida dopaminérgica es mayor en putamen que en caudado, esto no ocurre en primates expuestos de forma crónica al MPTP, donde la pérdida de dopamina es homogénea en todo el estriado (Pérez Otaño y cols., 1994). Otras zonas con inervación dopaminérgica como núcleo accumbens, hipocampo, amígdala y córtex cerebral también sufren pérdida dopaminérgica, no así el pálido lateral y medial (Scheider y cols., 1991). Las concentraciones de noradrenalina y serotonina no se modifican con la administración

aguda pero sí cuando son tratados de forma crónica con MPTP (Pérez-Otaño y cols., 1991). Aunque inicialmente disminuyen 5HIA, NA y 5HT, recuperan niveles normales a las 4-6 semanas (Jenner y cols., 1986). También están reducidos los niveles de distintos neuropéptidos, sustancia P, dinorfina, y encefalina en estriado y SN de animales tratados crónicamente con MPTP, como ocurre en pacientes afectados de EP (Pérez-Otaño y cols., 1992). El MPTP no produce alteraciones en los sistemas colinérgico, GABAérgico o glutamatérgico en primates (Garvey y cols., 1988).

B.3.d. Efectos en distintas especies

Entre distintas especies existen grandes diferencias en la susceptibilidad al efecto neurotóxico del MPTP. Las ratas son muy resistentes y aunque algunos estudios han demostrado alteración neuroquímica y morfológica (Sirinathsinghji y cols., 1988), en otros no han podido reproducir en roedores la toxicidad sobre el sistema nigroestriatal que se obtiene en primates y otras especies (Gibb y cols., 1988). El MPP+ inyectado en estriado en la rata es tóxico y produce destrucción de neuronas dopaminérgicas nigricas, lo que puede indicar algunos de los mecanismos que expliquen que la diferencia en susceptibilidad al tóxico implica factores que modifican la distribución y metabolización cerebral del MPTP (Johannessen y cols., 1985). Una gran variedad de primates subhumanos desarrollan un síndrome parkinsoniano cuando se les administra MPTP (Burns y cols., 1983; Jenner y cols., 1986; Langston y cols., 1984). Estos animales muestran disminución de la actividad espontánea, rigidez, bradicinesia y temblor.

La presencia de neuromelanina -en primates, perros y anfibios- se relaciona con mayor vulnerabilidad (Jenner y cols., 1986a, D'Amato y cols., 1987). La oxidación de 2,3-MPDP+ a MPP+ es catalizada por la neuromelanina, lo que puede explicar la mayor susceptibilidad de las especies con mayores concentraciones de esta sustancia (Trevor y cols., 1986). Las diferencias en la distribución de las formas de MAO A y B en estriado no justifican las diferencias encontradas: por ejemplo, el cobaya que presenta la forma B predominantemente (80%) es muy resistente, al igual que la rata que presenta más del 80% de tipo A (Heikkila y cols., 1986). Se han implicado otras diferencias metabólicas como la actividad de la MAO en los capilares en la barrera hematoencefálica (Kalaria y cols., 1987), variaciones del sistema de recaptación de dopamina (Lesch y cols., 1993) o

la velocidad de metabolización y eliminación del MPP⁺ (Giovanni y cols., 1994). La vida media biológica del MPP⁺ se correlaciona inversamente con la sensibilidad a la neurotoxina que presentan: en la rata se completa en menos de 24 horas, mientras que en primates se acumula en las neuronas melanizadas manteniéndose niveles mucho tiempo y en ratones la vida media es intermedia entre las otras dos especies (Del Zompo y cols., 1992; Langston y cols., 1986). La vida media del MPP⁺ es mucho mayor en monos que en ratones (Markey y cols., 1984; Johannessen y cols., 1985).

La susceptibilidad al MPTP se incrementa con la edad. Monos rhesus de 5 a 9 años requieren el triple de MPTP que animales de 20-23 años para desarrollar un cuadro clínicamente similar. Esto se intentó relacionar con el hecho de que los niveles de MAO B aumentan en LCR con el paso del tiempo. Pero ratones mutantes con superexpresión de MAO B no son más susceptibles al MPTP (Andersen y cols., 1994). También la menor susceptibilidad de los animales jóvenes puede estar relacionado con el hecho de que la neuromelanina se va acumulando en humanos hasta los 55-60 años. La actividad de la MAO es casi imperceptible en neonatos y aumenta a lo largo de los 2 primeros años en las ratas; por eso son más susceptibles al MPTP las ratas más viejas. La temperatura tiene también un papel en los niveles estriatales de MPP⁺: la hipotermia previene del daño dopaminérgico inducido por MPTP en ratón (Moy y cols., 1998). Quizás la dieta sea también importante ya que ratas con déficit en ascórbico son resistentes al MPTP al alterarse el funcionamiento del transportador de dopamina (Revuelta y cols., 1997).

B.3.e. Mecanismos de acción del MPTP

El MPTP ha de ser metabolizado (oxidado en la mitocondria) a ion 1-metil-4 fenil-piridinium (MPP⁺) para introducirse en las terminales dopaminérgicas y ejercer sus efectos neurotóxicos (Nicklas y cols., 1987). El MPTP se acumula en células con MAO B, probablemente en la glía, donde se convierte en MPP⁺. Este paso inicial no ocurre en neuronas, células con actividad MAO-B muy baja (salvo las serotoninérgicas del rafe, lugar donde inicialmente se pensó que ocurría). El MPTP se oxida en la mitocondria por acción de la MAO B (Chiba y cols., 1984) aunque también muy lentamente sin intervención enzimática (Di Monte y cols., 1995) a MPDP⁺, que se transforma espontáneamente en el metabolito activo MPP⁺ (Langston y Ballard, 1984;

Bradbury y cols., 1986). Aunque ambas formas de MAO oxidan el MPTP in vitro, únicamente los inhibidores de la forma B como selegilina y pargilina bloquean la toxicidad in vivo (Heikkila y cols., 1984). El MPP⁺ se libera de la glía y, gracias a una marcada selectividad por el sistema de recaptación de alta afinidad de la dopamina, penetra y se acumula en las neuronas dopaminérgicas (Burns y cols., 1983; Langston y cols., 1983; Shen y cols., 1985). En ratones transgénicos el aumento de la expresión del transportador de dopamina aumenta la sensibilidad al efecto tóxico del MPTP (Kostic y cols., 1997). La expresión del transportador de dopamina en otros tipos celulares mediante transfección génica confiere susceptibilidad al efecto citotóxico del MPP⁺ que se antagoniza con mazindol (Pifl y cols., 1993). Con mazindol y benztropina (inhibidores de la captación de DA) se minimizan los efectos del MPTP en ratón. Sin embargo, el bloqueo del sistema de recaptación de dopamina no siempre previene la toxicidad del MPTP; el bloqueo mediante el GBR12909 no lo hace (Sun y cols., 1988) y se ha demostrado que la inyección de altas dosis en distintos núcleos del sistema nervioso central es tóxica para otros tipos neuronales que utilizan distintos neurotransmisores (GABA, serotonina, acetilcolina). Esta toxicidad no selectiva se ha demostrado en la sustancia nigra reticularis (Jasso-López y cols., 1995), locus ceruleus (Forno y cols., 1986), núcleos dorsal y medial del rafe (Namura y cols., 1987) y estriado (Storey y cols., 1992). Las dosis más elevadas se asocian a mayor inespecificidad probablemente porque el MPP⁺ penetre en las células por difusión simple por gradiente de concentraciones (Heikkila y cols., 1985a).

Una vez dentro del terminal dopaminérgico el MPP⁺ es transportado hasta el soma neuronal (Campbell y cols., 1990) donde produce el efecto tóxico a través de distintos mecanismos (Tabla 2). La inyección de la toxina en el estriado induce una degeneración retrógrada de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta (Heikkila y cols., 1985b).

Tabla 2. Mecanismos de acción del MPTP

Bloqueo del complejo I (NADH-CoQ reductasa) de la cadena respiratoria mitocondrial	Nicklas y cols., 1985; Poirier y cols., 1985; Mytilineou y cols., 1985; Mizuno y cols., 1987; Chan y cols., 1991; Cleeter y cols., 1992
Radicales libres (hidroxilo)	Adams y cols., 1986; Przedborski y cols., 1992; Beal y cols., 1998
Inducción de proteínas de estrés	Neystat y cols., 1997
Potenciación de la excitotoxicidad mediada por glutamato	Sawada y cols., 1996
Genes de control de crecimiento	Trimmer y cols., 1996
Óxido nítrico	Hantraye y cols., 1996; Fujiyama y cols., 1996
Inhibición de TH	Ara y cols., 1998

El MPP⁺ se concentra activamente en la mitocondria mediante el transporte activo de cationes lipofílicos, con especial avidez en relación a la presencia en su estructura de un nitrógeno cuaternario, y produce inicialmente una privación energética por bloqueo de la fosforilación oxidativa. El MPP⁺ es una toxina mitocondrial que bloquea el complejo I (NADH-CoQ reductasa) de la cadena respiratoria *in vitro* (Nicklas y cols., 1985, Poirier y cols., 1985) e *in vivo*, aunque a concentraciones mucho mayores (Mytilineou y cols., 1985, Mizuno y cols., 1987). El MPP⁺ actúa en el mismo sitio de unión de la rotenona al complejo I (Heikkila y cols., 1985a) y ambas toxinas compiten en la unión (Kilbourn y cols., 1997). La presencia de MPP⁺ disminuye la actividad reductasa del complejo I de mitocondrias aisladas, en más del 50% la primera hora y la inhibición progresa al alargar el tiempo de exposición (Cleeter y cols., 1992). Esta caída en la producción energética conduce a un fallo en los mecanismos reguladores de la homeostasis neuronal, se produce una caída del potencial transmembrana mitocondrial y una masiva entrada de calcio activándose una serie de reacciones en cascada (alteración en organización de microfilamentos celulares, deplección de glutatión) que culminan en la degeneración y muerte de la neuronas (Chan y cols., 1991). Se produce una deplección de calcio mitocondrial seguido de un incremento de calcio citosólico. La prevención de la acumulación de calcio intracelular mediante pretratamiento con nimodipino (inhibidor del canal de Ca⁺⁺ tipo L) de forma

continua previene la pérdida de neuronas nigrales TH pero no protege de la deplección DA estriatal en ratones y en el tití (Kupsch y cols., 1995 y 1996). Los antagonistas NMDA bloquean de manera indirecta la entrada de calcio y protegen así de la toxicidad por MPTP (Turski y cols., 1991).

La inhibición del complejo I mitocondrial inicialmente es reversible pero, si se prolonga la exposición, es progresiva e irreversible. Esta segunda fase se previene con incubación con glutatión, ascórbico o catalasa en mitocondrias aisladas (Cleeter y cols., 1992) y con vitamina E, ascórbico, coenzima Q10 y catalasa (pero no con alopurinol ni con superóxido dismutasa) en cultivos de células mesencefálicas ventrales fetales de rata (Akaneya y cols., 1995). El pretratamiento con coenzima Q10 en ratones previene de la toxicidad del MPTP (Beal y cols., 1998). Estos experimentos sugieren la intervención de radicales libres de tipo hidroxilo, más que superóxido, en la toxicidad mitocondrial del MPP+. El MPP+ induce también peroxidación lipídica en cultivos de células dopaminérgicas (Hasegawa y cols., 1990). La interacción del MPP+ con el complejo I aumenta la producción de radicales libres que, a su vez, hacen progresar el daño del complejo I inhibiendo su actividad por completo (Adams y cols., 1986). Puede que el daño inicial sufrido por el complejo I por efecto del MPP+ le haga más vulnerable al daño oxidativo. Este papel de los radicales libres en la toxicidad del MPP+ es apoyado por el hecho de que los ratones transgénicos con superexpresión Cu/Zn SOD son resistentes al MPTP (Przedborski y cols., 1992). Nuevos estudios de este grupo (Przedborski y cols., 1997) en células mutadas que no tienen respiración mitocondrial y que son, sin embargo, sensibles a la toxicidad del MPP+ subrayan la relevancia de la producción de radicales libres en el mecanismo de acción citotóxica del MPP+.

El óxido nítrico (NO) parece jugar también un papel en la toxicidad del MPTP. 7-nitroindazole es un inhibidor de la isoforma neuronal de la óxido-nítrico-sintetasa (NOS) que bloquea la toxicidad por MPTP en ratón y en babuinos. Previene de la pérdida neuronal en nigra, de la deplección dopaminérgica en estriado y de las alteraciones motoras y cognitivas (Hantraye y cols., 1996). La NOS es una enzima dependiente de calcio cuya activación se produce por estimulación de receptores tipo NMDA. El NO puede inhibir a su vez la cadena respiratoria mitocondrial y/o formar peroxinitritos, que son inductores de estrés oxidativo (Dawson y cols., 1992). Además se piensa que la actividad de neuronas estriatales que liberan óxido nítrico (NADPH diaforasa positivas) puede ser regulada por contacto directo de neuronas dopaminérgicas

y que el NO controla la liberación de DA a través de dichos contactos (Fujiyama y cols., 1996).

En cultivos de células PC12, el MPP⁺ induce la expresión de proteínas de estrés (HSP), protein-quinasa calcio/calmodulina y protein-quinasa C (Neystat y cols., 1997). Los aminoácidos excitatorios pueden también estar implicados en la toxicidad del MPTP. En cultivo primario de mesencéfalo de rata el tratamiento con bajas dosis de MPP⁺ potencia la toxicidad del glutamato de forma que con dosis subletales se produce una severa lesión excitotóxica limitada a neuronas dopaminérgicas (Sawada y cols., 1996). También el sistema noradrenérgico endógeno modula la toxicidad del MPTP: protege de la deplección DA estriatal y de la muerte de células nigrales. Así pues la clonidina (un alfa 2 agonista), administrado antes y después del MPTP, previene la neurotoxicidad en ratón y la yohimbina (antagonista alfa 2) potencia la toxicidad del MPTP (Fornai y cols., 1995).

Pero antes de inducir muerte neuronal, el MPP⁺ (y su homólogo endógeno 2,9-di-methyl-norharmanium (2,9-Me₂NH⁺)), entran en las células dopaminérgicas e inhiben la síntesis de dopamina. El MPP⁺ inhibe la activación de la TH a dosis tan bajas como 0,05 µM (Matsubara y cols., 1995). En pacientes con EP y en modelos experimentales el descenso de DA excede proporcionalmente a la degeneración neuronal, pudiéndose explicar este hecho por la inhibición de la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, la TH. El MPTP produce nitración de los residuos tirosina de este enzima, lo que se traduce en una pérdida de actividad sin cambio inicial en la cantidad de proteína TH. En ratones que expresan mayor cantidad de SOD Cu /Zn no se produce nitración de la TH tras MPTP ni desarrollan posteriormente déficit dopaminérgico por lo que puede que éste sea un mecanismo inicial en la secuencia patogénica de la toxicidad por MPTP (Ara y cols., 1998). También el MPTP produce una inhibición competitiva de la MAO, sobre todo del subtipo A, etiquetándose tal acción de suicida por bloquear de esa manera su activación (Salach y cols., 1984).

El gen p53 junto con otros genes de control de crecimiento pueden regular la muerte neuronal en EP y en los modelos experimentales. La proteína p53 parece necesaria para la completa expresión de la toxicidad del MPTP ya que en ratón trasgénico que no expresa esta proteína no hay disminución del número de neuronas que expresan TH en sustancia nigra tras exponerlas a MPTP (Trimmer y cols., 1996).

En la Tabla 3 se resumen las similitudes y diferencias entre el modelo en primates y la enfermedad de Parkinson.

Tabla 3. Diferencias y analogías entre la enfermedad de Parkinson y el parkinsonismo inducido por MPTP en primates (Modificado de Gerlach y cols., 1991).

	Enfermedad de Parkinson	Parkinsonismo por MPTP
<i>Sintomatología</i>	Acinesia, rigidez, temblor de reposo	Acinesia, rigidez Raro temblor de reposo
Respuesta a DA y agonistas DA	Sí	Sí
Progresión de sintomatología	Sí	Sí ?
Regresión de sintomatología	No	Ocasional ?
<i>Neuropatología</i>		
Pérdida de neuronas DA en SN	Sí	Sí
Predominio en tercio lateral de SN	Sí	No
Pérdida discreta en sist. mesolímbico	Sí	Sí
Mayor cantidad de neuromelanina	Sí	No
Cuerpos de Lewy	Sí	No
Degeneración locus coeruleus	Sí	Sí/No
<i>Neuroquímica</i>		
Deplección de DA estriatal	Sí	Sí
Disminución de actividad TH	Sí	Sí
Deplección de DA extraestriatal	Sí	Sí
Deplección de serotonina, noradrenalina...	Sí	Sí, transitoria
Deplección de neuropéptidos	Sí	Sí
<i>Receptores dopaminérgicos</i>	Aumento D2, no cambios D1	Aumento D2, no o leve incremento D1
<i>Incremento en peroxidación lipídica</i>	Sí	Sí
<i>Incremento de hierro</i>	Sí	Sí
<i>Alteración homeostasis del calcio</i>	Sí	Sí
<i>Alteración cadena respiratoria mitocondrial</i>	Alteración complejo I y III	Alteración complejo I

C. Factores neurotróficos

C.1. Definición y evolución histórica

Los factores de crecimiento o neurotróficos (FN) son sustancias que bloquean la muerte celular ante diversos estímulos nocivos y favorecen la diferenciación selectiva de determinadas neuronas. Aumentan la supervivencia y la actividad funcional de las neuronas e inducen la diferenciación de precursores inmaduros y la reinervación de los órganos diana. Favorecen la sinaptogénesis, la innervación y la creación de circuitos neurales y estimulan la producción de neurotransmisores y de sus receptores. Levi Montalcini (1951) estableció la hipótesis de que la supervivencia de distintos grupos

neuronales durante el desarrollo depende del acceso de estas células a una serie de sustancias químicas denominadas factores neurotróficos que, actuando a través de receptores específicos, facilitan su supervivencia, favorecen su diferenciación y desarrollo, la invasión de los órganos diana y potencian las propiedades neurotransmisoras de esas células. Inicialmente, para que un FN fuera considerado como tal habría de ser producido y liberado por las células diana, ligado por receptores y transportado retrógradamente al soma neuronal para ejercer su acción. Pero actualmente se sabe que un FN afecta a múltiples poblaciones neuronales y que cada neurona responde a varios FN. Además responden a FN transportados anterógradamente y a aquéllos secretados por ellas mismas o por células cercanas, epéndimo, LCR o circulantes en la sangre. Desde el punto de vista terapéutico son sustancias prometedoras en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El primer factor neurotrófico aislado fue el NGF (Liuzzi y cols., 1965), en 1989 se determinó la estructura del BDNF (Leibrock y cols., 1989) y progresivamente se han ido caracterizando un elevado número, subtipos, receptores, mecanismos de actuación y se ha probado su eficacia en distintos modelos de enfermedades neurológicas. Las nuevas tendencias en investigación sobre factores tróficos incluyen modificaciones mediante ingeniería genética de distintas líneas celulares para que, implantadas, secreten determinado FN; uso en mejoría de supervivencia de trasplantes neurales; empleo como inductores de multiplicación y diferenciación desde precursores neuronales a neuronas dopaminérgicas que serán empleadas en trasplantes.

C.2. Clasificación y receptores

Los FN se pueden clasificar según su estructura y mecanismo de actuación (Tabla 4) pero, debido a los constantes avances en su caracterización, las clasificaciones son variadas. Muchos de éstos son péptidos o proteínas, pero también los hay con estructura lipídica (gangliósidos, ceramidas). Los factores promotores de neuritas únicamente estimulan el desarrollo de conos de crecimiento y orientan a las neuritas. Los denominados factores neuronotróficos son aquéllos que estimulan crecimiento y diferenciación de neuronas. Es a éstos a los que nos referiremos en lo subsiguiente como FN. Las neurotrofinas son proteínas homodiméricas de aproximadamente 120 aminoácidos con una homología en la secuencia de aproximadamente un 50%, se

producen en los órganos diana y actúan sobre receptores semejantes. Los factores gliotróficos son péptidos pleiotrópicos (proviene de un mismo gen ancestral) y tienen también acción sobre otros sistemas no neurales.

Tabla 4. Clasificación de los factores neurotróficos

I. Factores neuronotróficos o verdaderos factores neurotróficos: Estimulan crecimiento y diferenciación de neuronas.

I.A. mediante acción directa sobre neuronas (neurotrofinas)

I.A.1. factor de crecimiento nervioso (NGF)

I.A.2. factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

I.A.3. neurotrofinas 3, 4/5 y 6

I.B. mediante la regulación de la actividad y proliferación glial (factores gliotróficos)

I.B.1. factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

I.B.2. factores de crecimiento epidérmico (EGFs)

I.B.3. factor de crecimiento tipo insulina (IGF)

I.B.4. factor neurotrófico ciliar (CNTF)

I.B.5. factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

I.B.6. factor que transforma crecimiento (TGF)

I.B.7. factor inhibidor de leucemias/factor de diferenciación colinérgica (LIF/CDF)

I.B.8. factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y factores relacionados:
neurturina y persephin

I.B.9. interleucinas

I.B.10. gangliósidos

I.C. inmunofilinas, plasminógeno

II. Factores promotores de neuritas: estimulan conos de crecimiento y orientan neuritas

II.A. laminina

II.B. fibronectina

II.C. colágeno

II.D. S 100b

II.E. nexina derivada de la glía

III. Factores inhibidores:

III.A. Factores inhibidores de neuritas (NIFs)

III.B. Factores antiproliferativos neurales (NAFs)

Todos los FN tienen una serie de propiedades, aunque cada tipo cumplirá con mayor o menor intensidad estas acciones. Guían las proyecciones neuronales y favorecen el establecimiento de sinapsis (neurotropismo); aumentan la supervivencia de neuronas y confieren resistencia a la lesión (neurotrofismo) y favorecen la mitogénesis y la diferenciación neuronal hacia determinado fenotipo morfológico y neuroquímico. Estas acciones las pueden realizar mediante actuación directa sobre las neuronas (neurotrofinas) o bien a través de la regulación de la actividad glial (FN gliotróficos). Algunos FN gliotróficos, como el FGF y el CNTF, tienen también un efecto directo sobre las neuronas. Muchos de los FN actúan desde los lugares diana (en el caso de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, desde el estriado) favoreciendo el crecimiento y diferenciación selectivo de las neuronas que deben establecer allí sus conexiones. Así, por ejemplo, neuronas embrionarias mesencefálicas cocultivadas con células estriatales muestran mayor crecimiento, mayores índices de captación de DA y más ramificaciones que cuando se añaden al cultivo neuronas cerebelosas (Manier y cols., 1997).

Cada tipo de neuronas puede responder de forma selectiva a uno o varios FN, según los receptores funcionantes en su membrana. Pero éste no es el único condicionante para que haya una respuesta. Puede estar condicionada a través de células circundantes que sí expresen esos receptores y cuya actividad se modifique por la presencia de ese FN, como pueden ser las células gliales en el caso de FN gliotróficos. Así se puede explicar el hecho de que en neuronas dopaminérgicas, que carecen del receptor para NGF, la administración de este factor revierte las alteraciones conductuales en ratas lesionadas con 6-OHDA (Pezzoli y cols., 1988). Además, neuronas con el mismo fenotipo neurotransmisor en distintas localizaciones no expresan los mismos receptores. Por ejemplo, las neuronas colinérgicas mesencefálicas expresan receptores para NGF y no las colinérgicas estriatales. Igualmente se pueden localizar en distintas zonas cerebrales la presencia de los RNAm, siendo lógico pensar que la actuación fisiológica de ese factor implique esas localizaciones. Por ejemplo, se ha localizado RNAm de GDNF en estriado, médula espinal, ganglio cervical superior, ganglio dorsal, tálamo, hipocampo, corteza, cerebelo y, fuera del sistema nervioso central, en músculo, en las células de Schwann, en riñón y tracto gastrointestinal en desarrollo. La complejidad de la acción de los FN es aún mayor ya que un efecto puede estar condicionado por la interacción de distintos factores (por ejemplo NGF y BDNF

muestran efectos potenciadores en incrementar la actividad acetil transferasa; el efecto neuronal del FGF se encuentra mediado por IGF; FGF-2 en cultivos de neuronas hipocampales sin suero produce un incremento en el RNAm y en la inmunoreactividad al NGF (Ferhat y cols., 1997). Además, el papel del factor puede ser distinto según el subtipo neuronal analizado. Por ejemplo el FGF-2 en la médula adrenal puede actuar como factor diferenciador de células progenitoras, como factor derivado de la diana para neuronas pregangliónicas que inervan la médula adrenal o como un factor auto-paracrino para las células de la propia glándula (Grothe y Meisinger, 1997). En la Tabla 5 se resumen los diferentes subtipos neuronales sobre los que son activos algunos FN.

Tabla 5. Células diana de distintos factores neurotróficos.

NGF:	sensoriales, neuronas colinérgicas septo-hipocampales
BDNF:	neuronas de la retina, septales, dopaminérgicas mesencefálicas
CNTF:	motoneuronas bulbares y espinales, neuronas simpáticas y parasimpáticas
FGF:	fotoreceptores, glía, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas
EGF:	células epidérmicas, células parietales, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas
IGF:	células granulosas y de la oliva
GDNF:	neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, motoneuronas espinales

Como ya ha sido mencionado, los FN ejercen su acción a través de receptores presentes en las células diana. Los receptores de las neurotrofinas tienen dos zonas de unión: una de alta afinidad de la que depende la actividad biológica y otra de baja afinidad (LNGF-R), que potencia la respuesta. El protooncogen trk (tirosina kinasa) es parte del receptor de alta afinidad y codifica una glicoproteína transmembrana. Hay distintos subtipos: el trk A es parte del receptor del NGF, el trkB del BDNF y de las NT 4 y 5 y el trk C para NT3. Los receptores de los factores gliotróficos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Receptores de factores neurotróficos gliotróficos

Factor	Receptor
EGF	EGF-R
AFGF	FGF R1-4
BFGF	FGFR 1-3 (bek y flg)
IGF I y II	IGF R 1 y 2
CNTF	CNTF R a, LIF b gp 130
GDNF	c-Ret tyrosin kinasa
Neurturina	NTNR-a

C.3. Mecanismos de actuación

Los mecanismos de acción de los FN son múltiples. En ocasiones, la unión del FN al receptor condiciona un cambio conformacional de éste; el receptor entonces interacciona con proteínas plasmáticas y se produce inducción de la actividad tirosina kinasa a través de autofosforilación de los residuos de tirosina presentes en el dominio intracelular del receptor (Soppet y cols., 1991). Se activan entonces segundos mediadores intracelulares que condicionan expresión de genes, mRNA y cambios en proteínas que conllevan la diferenciación celular. Mediante inhibición de la síntesis de RNA o de proteínas puede entonces bloquearse la acción de determinados FN. Algunos FN promueven la mitosis (FGF2, IGF1, EFG). BDNF y GDNF no lo hacen, por lo que parecen inicialmente más seguros, ya que entre sus efectos secundarios no entraría la proliferación celular anómala. Tras la unión, el complejo neurotrofina-receptor es internalizado y transportado retrógradamente desde el axón hacia el soma, donde se activan múltiples vías, una de las cuales es la que depende del protooncogen ras (Ebady y cols., 1997).

Otro mecanismo de actuación es a través de la inhibición de la apoptosis. La muerte neuronal asociada a privación de FN tiene características semejantes a la apoptosis (arrugamiento del citoplasma, condensación de la cromatina y degradación del DNA en fragmentos oligonucleosomales). Algunas enfermedades neurodegenerativas se asocian a un aumento de la apoptosis, lo que puede estar condicionado por la privación de FN (Thompson y cols., 1995). Los FN no aumentan los niveles de Bcl2

(proteína inhibidora de apoptosis) por lo que presumiblemente actúan inhibiendo la apoptosis a través de otros mecanismos, por ejemplo el IGF modulando otras proteínas de la cascada apoptótica (bax, bcl x, bcl-2).

Existen pues múltiples mecanismos moleculares de actuación de los FN (Tabla 7) e incluyen protección ante la acción de radicales libres, como activación de catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa (Nístico y cols., 1992), e inhibición de excitotoxicidad: bFGF inhibe la síntesis de una subunidad del receptor del glutamato tipo NMDA y aumenta la síntesis de calbindina, una molécula que se encarga de modular un adecuado metabolismo del calcio.

Mediante todos estos mecanismos las actuaciones finales de los FN en los procesos neurodegenerativos podrían resumirse en: protección de las neuronas frente a la degeneración y potenciación de la actividad de estas neuronas supervivientes favoreciendo el establecimiento de colaterales axónicas, de la arborización neurítica y la síntesis de neurotransmisores.

Tabla 7. Mecanismos de actuación de los factores neurotróficos.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - activación de la hidrólisis del fosfatidil inositol. - activación de intercambios iónicos de membrana. - activación de la proteína asociada a microtúbulos. - activación de protein kinasas dependientes de AMPc. - activación de serin treonin kinasas. - cambios en el metabolismo oxidativo de las células. - restauración del potencial transmembrana mitocondrial y de la homeostasis del calcio. Inducción de calbindina, proteína moduladora del metabolismo del calcio. - estimulación del paso de fase celular Go a G1 y mitogénesis. - inhibición de apoptosis. - modulación de proteínas implicadas en plasticidad sináptica y axogénesis (GAP-43, PSA-NCAM). |
|---|

C.4. Modificaciones fisiológicas, patológicas y experimentales de los factores neurotróficos

La expresión de FN y sus receptores y, por tanto, la aparición de efectos farmacológicos mediados por estas sustancias varía a lo largo del desarrollo de una célula. Las neuronas modifican las necesidades de FN y, por tanto, de sus receptores de

membrana a lo largo del período evolutivo. En ocasiones modifican sus necesidades hacia FN derivados de sus órganos diana para mantener sus características de diferenciación. Por ello un FN puede ser efectivo, por ejemplo, en el mantenimiento de la supervivencia durante el período embrionario y no para revertir alteraciones secundarias a procesos neurodegenerativos. Sin embargo, no se conoce que un FN con actividad relevante durante la vida adulta carezca de ella durante el período embrionario. En este sentido, por ejemplo, los niveles de NGF disminuyen con la edad y hay poca cantidad de BDNF en cerebro adulto; los niveles de RNAm de GDNF están altos durante el desarrollo embrionario, disminuyen durante el período postnatal y después se mantienen estables durante la vida. Los niveles de FGF se mantienen estables con la edad pero bajos en la EP (Tooyama y cols., 1993), aunque no se puede conocer si esto juega un papel patogenético o sólo es una consecuencia de la pérdida neuronal; los receptores para EGF disminuyen con el envejecimiento y desaparecen en sustancia nigra tras la lesión por 6-OHDA (Seroogy y Gall, 1993) y en estriado se produce una pérdida progresiva de mRNA de EGF. Además la actividad de un FN puede variar con el período evolutivo. Por ejemplo IGF es neurotrófico en cerebro en desarrollo pero sólo neuromodulador en cerebro adulto.

También la expresión de FN puede modificarse mediante estímulo o lesión neuronal. Así pues crisis epilépticas, trauma, isquemia y ácido kaínico aumentan la expresión de FGF, IGF, TGF b, ILK-1 (Isacson, 1995). La supervivencia de neuronas dopaminérgicas es influenciada de distinta manera según sea el período evolutivo y el origen (mesencefálico, estriatal o cortical) de las células productoras de los factores tróficos. También los efectos son distintos en neuronas mesencefálicas obtenidas en distintos tiempos evolutivos: durante el período precoz son más efectivos factores derivados de glía aún no claramente conocidos y durante períodos más tardíos son más eficaces factores con actividad autocrina (como BDNF y GDNF) (Engel y cols., 1998).

C.5. Neuroprotección y neurorestauración

Clásicamente se ha considerado a las neuronas como células sin capacidad de división, pero cada vez hay más evidencias de que son capaces de regenerarse y de que, incluso en cerebros adultos, siguen existiendo neuronas multiplicándose. En términos globales, en el sistema nervioso fetal se producen hasta un 50% más de neuronas que las

que después van a persistir en el adulto, degenerando de manera progresiva y selectiva, en función de la zona, de las terminales y de estímulos físicos y químicos. La ablación de la zona diana hace que el porcentaje de supervivencia sea mucho menor. A través de sangre, glía, matriz extracelular, aferencias, eferencias e incluso de manera autocrina llega información trófica a una neurona que la condiciona a crecer, diferenciarse y/o multiplicarse. Esto confiere una plasticidad a la neurona para poder adaptarse a nuevas situaciones. La disminución temporal o espacial de alguno de esos factores, sea de causa genética, traumática, física o tóxica, tanto durante el desarrollo como la vida adulta, producirá una serie de reacciones celulares que pueden conducir a la muerte selectiva de determinadas poblaciones neurales y ser la explicación etiológica de algunas enfermedades neurodegenerativas.

Se llama neuroprotección a una intervención terapéutica que tiene por objeto suprimir, disminuir o enlentecer el efecto nocivo de un elemento patógeno, genético o ambiental y, por tanto, conseguir un curso más benigno de una enfermedad. Como ha sido referido, los avances en el tratamiento de la EP a lo largo de los años han sido sobre todo a efectos sintomáticos. De los fármacos disponibles actualmente se considera que la selegilina es el fármaco con mejor acreditado efecto neuroprotector. La acción protectora de los fármacos dopaminomiméticos es muy difícil de probar por la complejidad de la diferenciación del efecto sintomático. Algunos agonistas (bromocriptina, pergolide, pramipexole) han demostrado efectos neuroprotectores *in vitro* y se especula sobre su capacidad de disminuir la aparición de fluctuaciones y disquinesias en pacientes tratados a largo plazo. En la EP existe un incremento en el metabolismo de la dopamina como mecanismo de compensación de la degeneración neuronal, lo que constituye una fuente de radicales libres vía MAO que podría contribuir a la progresión de la enfermedad. El teórico papel neuroprotector de los agonistas de DA se basa en su propiedad de frenar dicho aumento de metabolismo mediante la acción inhibitoria atribuible a su efecto sobre autorreceptores. En el metabolismo de los agonistas dopaminérgicos no se producen metabolitos tóxicos ni se favorece la síntesis de radicales libres, como ocurre con la L-DOPA. La L-DOPA, que sin ninguna duda alarga la esperanza de vida de los pacientes, ha sido considerada como tóxica *in vitro* durante muchos años pero datos recientes sugieren que pudiera incluso ser neurotrófica. El amantadine y algunos fármacos de estructura relacionada, bloqueantes débiles de

receptores de aminoácidos excitatorios podrían, teóricamente, tener efectos neuroprotectores, que por el momento están sin investigar.

C.6. Vías de administración

La utilización clínica de los FN plantea el problema de su administración puesto que, debido a su gran tamaño molecular, no atraviesan la BHE. Únicamente en algunas enfermedades neurológicas (como en neuropatías periféricas y quizás en la esclerosis lateral amiotrófica), la administración sistémica de FN puede ejercer su acción en el nivel lesional. Para solventar este problema se han empleado diversos métodos. Se han empleado administración intraparenquimatosa e intraventricular mediante inyecciones repetidas o a través de catéteres. También se ha usado infusión continua mediante bombas osmóticas o electromecánicas programables conectadas a catéteres intraventriculares o intraparenquimatosos, no conociéndose actualmente si es mejor una liberación continua o pulsada. La administración intraventricular puede producir problemas derivados de la dificultad de acceso del factor a la población diana. Por ejemplo, la administración intraventricular de NGF produce hiperplasia de las células de Schwann (Winkler y cols., 1997) y la de EGF, hidrocefalia secundaria a crecimiento de células endimarias. Otra alternativa consiste en aplicar terapia génica: manipular una línea celular para que exprese determinados factores tróficos (Gage y cols., 1991). Se han empleado células autólogas neurales (Snyder y cols., 1994; Yoshimoto y cols., 1995), fibroblastos (Fisher y cols., 1991; Frim y cols., 1994), células tumorales y células heterólogas (porcinas). Las células neurales se pueden integrar mejor en la citoarquitectura cerebral. Estas células modificadas se pueden transplantar junto a células fetales o adrenales o implantar en cápsulas de polímeros que faciliten la difusión del factor disminuyendo así la antigenicidad y la posibilidad de un crecimiento neural desordenado (Hoffman y cols., 1993). Células encapsuladas también se han implantado en espacio intratecal para que allí liberen el factor (Aebischer y cols., 1996). Virus que pueden infectar células neurales han sido modificados genéticamente para transportar genes productores de FN dentro del sistema nervioso central (Choi Lundberg y cols., 1996; Freese y cols., 1996). También se han utilizado sistemas transportadores para conseguir el acceso del FN al cerebro. Combinado con anticuerpos frente a transferrina,

el NGF es capaz de atravesar la BHE usando el transportador activo de esta proteína (Friden y cols., 1993).

Debido, pues, a las diversas vías de administración en diferentes experimentos, las diferentes dosis de cada FN empleadas y los intervalos de tiempo distintos, los resultados de eficacia son, en ocasiones, difícilmente comparables y se encuentran aún pendientes de determinar dosis óptimas en humanos.

C.7. Factores tróficos dopaminérgicos

C.7.a. Generalidades

Los criterios de neurotrofismo sobre células ricas en dopamina (DA) exigen demostrar *in vitro* e *in vivo* la capacidad de diferenciación a fenotipo dopaminérgico y de protección de dichas neuronas frente a neurotoxinas, lesiones mecánicas u otros insultos. Es necesario demostrar la existencia de receptores, que el factor es capaz de inducir o potenciar el fenotipo dopaminérgico y que es capaz de aumentar la supervivencia de células ricas en DA durante el desarrollo y durante situaciones de degeneración, tras exposición a neurotóxicos y tras heterotransplante, favoreciendo la neurotransmisión y la conectividad sináptica de estas células. Todo esto ha de demostrarse *in vitro* y en modelos experimentales vivos. En la [Tabla 8](#) se reseñan los marcadores biológicos y conductuales de neurotrofismo para células ricas en DA.

Aún no se conoce cual es el factor o factores críticos en el desarrollo de las células de la sustancia nigra. Mediante manipulación genética, creando animales que carecen de determinado gen codificador de un FN o de sus receptores, o mediante anticuerpos intraútero contra los factores, se crean ejemplos del desarrollo privado de un FN. Así se ha evaluado que ni la supresión de neurotrofinas ni la de CTNF producen anomalías en la SN. El ratón sin genes para BDNF tiene degeneración de ganglios sensoriales pero las neuronas son morfológicamente normales en la SNpc (Liu y cols., 1995). La anulación del receptor de EGF produce animales pequeños con anomalías del epitelio cutáneo, pulmonar e intestinal pero sin alteraciones en el tejido nervioso (Miettinen y cols., 1995). El ratón sin gen GDNF tiene agenesia renal y ausencia de neuronas entéricas, falleciendo al día 1,5 postnatal pero no hay defectos en el SNC, sobre todo no hay alteraciones dopaminérgicas (Pichel y cols., 1996; Sánchez y cols.,

1996). Uno de los factores que puede complementar esa deficiencia es la neurturina, una molécula relacionada estructuralmente con el GDNF. Los factores pueden actuar secuencialmente en distintos pasos del desarrollo y diferenciación a fenotipo dopaminérgico. Por ejemplo, BDNF es más efectivo en inducir captación de DA, ILGF en promover la supervivencia y el bFGF tiene una acción intermedia en neuronas dopaminérgicas de rata en desarrollo (Beck y cols., 1993). La presencia y actividad de los diversos FN en las distintas áreas cerebrales es pues algo dinámico, evolutivo y adaptativo.

Tabla 8. Marcadores biológicos y conductuales de neurofismo para células ricas en DA.

MARCADORES	SIGNIFICADO	LIMITACIONES
I. Biológicos		
TH	Proteína limitante en la síntesis de catecolaminas. Indica cuerpos y terminales de células ricas en catecolaminas.	Variaciones en positividad por:distinta expresión del gen o cambios en el nivel de proteína
Lugares de captación (3H-DA) o transporte de alta afinidad de DA	Marca terminales presinápticos	Puede indicar un cambio del número de neuronas o de las ramificaciones presinápticas
Niveles de DA, metabolitos u otras catecolaminas	Marcan el estado de neurotransmisión	Depende de factores farmacológicos
Captación de 18F-DOPA u 11C-b CIT	Densidad y actividad de terminales	Costoso
II. Conductuales		
Motilidad, signos de parkinsonismo	Estado funcional de la transmisión nigroestriatal	Subjetividad, dependencia del estado general del animal
Conductas rotatorias inducidas por agonistas	Grado de asimetría de la transmisión nigroestriatal	Dependencia del estado de los receptores

C.7.b. Estudios in vitro.

Los efectos moleculares de los factores tróficos se han estudiado in vitro, fundamentalmente en células de feocromocitoma (células PC12), células de neuroblastoma (NB69) y cultivos de células dopaminérgicas mesencefálicas de rata en período embrionario o postnatal. Un efecto trófico dopaminérgico in vitro se evalúa mediante cuantificación de la supervivencia neuronal ante la muerte programada o ante neurotóxicos, del crecimiento neural y desarrollo de neuritas, comparando índices de recaptación de DA o de expresión de TH (RNA, inmunotinción) y los lugares de captación de dopamina. La TH es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas

pero que una célula exprese TH no implica necesariamente que actúe como dopaminérgica. Una célula TH+ con ausencia de reactividad para dopamina β hidroxilasa, dopa decarboxilasa y feniletanolamina-N metil transferasa se asume que es dopaminérgica (Ostegaard y cols., 1991). También se asume que una célula que se tiñe con anticuerpos anti-tirosina hidroxilasa y con anticuerpos anti-transportador de dopamina (DAT) se comporta funcionalmente como una neurona dopaminérgica (Betarbet y cols., 1997) y es sobre estas células donde se estudian los efectos tróficos.

Las células de neuroblastoma derivan de la cresta neural y puede modificarse su tasa de división y grado de diferenciación (Cooper y cols., 1991). Las células de feocromocitoma (PC12) se han estudiado como posibles células candidatas a trasplante ya que liberan tanto catecolaminas como factores tróficos, como el bFGF (Grothe y Meisinger, 1997). Estas células pueden pasar a estado postmitótico, desarrollar neuritas, generar potenciales de acción y sintetizar catecolaminas (Mena y cols., 1989) y formar neuritas en respuesta al NGF y al bFGF (Glowacka y cols., 1990). Las NB69 expresan TH espontáneamente (Mena y cols., 1987) pudiéndose estimular dicha actividad con análogos del AMPc, NGF y bFGF, productos que también inducen su diferenciación a fenotipo dopaminérgico. FGF es el FN más potente inductor de la síntesis de catecolaminas en NB69, seguido de IGF y NGF. Este efecto se realiza a través de activación de la proteína-kinasa-A. La combinación de NGF y AMPc produce una rápida elongación de neuritas (Gunning y cols., 1981). NGF y bFGF promueven la extensión de neuritas en PC12 (Rydel y Green, 1987). El implante de polímeros encapsulados de células PC12 mejora parámetros motores en modelos experimentales de EP. Al realizar PET con 18F-DOPA, de 5 a 13 semanas después de ser implantados en sustancia blanca parietal de 4 monos lesionados con MPTP, se observan zonas funcionantes con actividad dopaminérgica (Subramanian y cols., 1997). Pero no es extrapolable un efecto evidenciado en determinado modelo in vitro a lo que se obtiene en modelos experimentales vivos ni estos últimos a lo que ocurre en la EP. En este sentido, por ejemplo, BDNF mostró buenos resultados en neuronas fetales que no fueron corroborados en células de neuroblastoma ni en modelos in vivo.

Un gran número de FN, entre los que se incluyen las neurotrofinas BDNF y NT-4/5, la insulina y los péptidos relacionados IGF-1 y -2, los FGF ácido y básico, el EGF, TGF α y GDNF y otras moléculas como plasminógeno, cerámidos, etc., favorecen el crecimiento y diferenciación de neuronas DA (Ferrari y cols., 1989; Knusel y cols., 1991;

Hyman y cols., 1991; Alexi y cols., 1993; Beck y cols., 1993; Lin y cols., 1993; Nagata y cols., 1993; Spina y cols., 1992; Park y cols., 1992; Otto y Unsicker., 1993). Se comentan de manera más detallada resultados obtenidos previamente con los FN empleados en nuestros experimentos.

C.7.c. GDNF

Inicialmente Lin y cols., en 1993, purificaron un factor de una línea glial de rata que promovía la captación de dopamina en cultivos de células embrionarias mesencefálicas. Clarkson y cols., en 1995 demostraron que reducía la apoptosis en neuronas dopaminérgicas de cultivos mesencefálicos embrionarios. Se pensó en un primer momento que era trófico específico sobre el sistema dopaminérgico porque no afectaba la supervivencia de neuronas serotoninérgicas ni GABAérgicas, pero se ha visto que GDNF es un FN también efectivo sobre sistemas no dopaminérgicos. Promueve supervivencia de motoneuronas (Yan y cols., 1995) y la de neuronas periféricas de ganglios simpáticos (Ebendal y cols., 1995). Recientemente se ha clonado el gen que lo codifica en ratón (Matsushita y cols., 1997). Tiene una relación estructural con la superfamilia del TGF-beta, pero al contrario que otros miembros que actúan a través de un receptor serin-treonin-kinasa, lo hace mediante una tirosina kinasa. El GDNF y la neurturina se unen al complejo receptor Ret tyrosin kinasa (Buj-Bello y cols., 1997). La señal a través de c-Ret es dependiente de la unión previa de GDNF a una proteína auxiliar (GDNFR alfa) que está ligada a membrana vía un glicofosfatidilinositol (Jin y cols., 1997a; Treanor y cols., 1996). La unión de GDNF a su receptor alfa condiciona la fosforilación del protooncogen Ret (Araujo y cols., 1997). La unión de neurturina está mediada por un receptor denominado NTNRea (Buj-Bello y cols., 1997). Se han identificado distintos subtipos de receptores (Jing y cols., 1997b) pero los mecanismos de actuación molecular aún no están totalmente definidos. La acción del GDNF está mediada por síntesis de proteínas ya que es abolida con inhibición de síntesis proteica con cycloheximina. Tiene 134 aminoácidos y actualmente es el que mayor potencia ha demostrado en aumentar la supervivencia in vitro de neuronas dopaminérgicas y la captación de DA.

El RNAm del GDNF se expresa con mayor abundancia en caudado y en menor nivel en putamen y no se detecta en nigra lo que sugiere que el GDNF es un factor derivado de la diana en humanos (Schaar y cols., 1994). Los mayores niveles de RNA se encuentran en el estriado en desarrollo. Durante el período embrionario su RNAm se encuentra en testículo, ovario, estómago, piel, astrocitos y médula. Cuando la división de neuronas nigroestriatales en la rata finaliza (día embrionario 15), altas concentraciones de GDNF se encuentran en mesencéfalo pero poco en estriado. En estriado de ratón adulto se expresa poco, por lo que no parece tener un papel en ese período de tiempo, pero sí que aumenta su expresión tras lesión mecánica (el incremento colocaliza con macrófagos NSE y microglia MAC 1, no en astrocitos) (Batchelor y cols., 1998). A nivel celular el GDNF se expresa fundamentalmente en células gliales, sobre todo en astrocitos.

Se piensa que además de su papel como trófico retrógrado del sistema dopaminérgico puede también actuar localmente en estriado, favoreciendo la inducción del fenotipo calretinin positivo y protegiendo estas neuronas contra la toxicidad mediada por glutamato (Farkas y cols., 1997a).

En la Tabla 9 se esquematizan resultados publicados en los que se empleó GDNF en relación con el sistema dopaminérgico.

Tabla 9. Resumen de estudios con GDNF en modelos de parkinsonismo en roedores y primates.

Modelo	lesión	Vía	efecto*	
Ratón	MPTP 6-OHDA/ axotomía	nígrica/ estriatal	DA, TH+ n° neuronas	Tomac y cols., 1995 Lu y Hagg y cols., 1997
	MPTP	adenovirus SN	DA estr	Mandel y cols., 1997
Rata	sana	nígrica única	Act mot, fibras TH+, DA SN	Hudson y cols., 1995
	sana	intraventricular única	DA SN	Martin y cols., 1996
	sana, recién nacida	bilateral estriatal	distonía, DA SN	Beck y cols., 1996
	sana, anciana	única nígrica	Act mot, DA estr	Hebert y cols., 1997
	6-OHDA estr o nigra	estriatal	DA estr	Cass y cols., 1996
	6-OHDA nigra	nígrica	n° SN, DA SN, DA estr	Kearns y cols., 1997
	6-OHDA	nígrica	n° SN	Sauer y cols., 1995
	6-OHDA	nígrica	rotación, TH+ SN	Bowenckamp y cols., 1995
	6-OHDA estr	estriatal	rotación, fibras TH+, TH+ SN	Shults y cols., 1996
	6-OHDA	nígrica/ ventricular	rotación, TH+ SN, DA SN	Lapchack y cols., 1997
	6-OHDA bilateral	ventricular	Act mot, TH+ SN, DA SN	Bowenckamp y cols., 1997
	6-OHDA estr	estriatal	Act mot, fibras TH+	Rosenblad y cols., 1998a
Primates	6-OHDAestr	estriatal/ ventricular	Fibras TH+, TH+ SN	Rosenblad y cols., 1998b
	6- OHDA	minibomba estr/ ventricular	Act mot, rotación	Zirik y cols., 1998
	6-OHDA estr	adenovirus SN	n° SN	Choi Lundberg y cols., 1997
	6-OHDA estr	adenovirus SN	n° SN, TH+ SN	Mandel y cols., 1997
	6-OHDA	adenovirus estr	Rotación, n° TH+ SN	Granholm y cols., 1997
	6-OHDA FLM	estr + células fetales estr	Inervación/ tamaño del trasplante	Oertel y cols., 1998
	axotomía	polímeros encapsulados en FLM	Rotación, TH+ SN	Tseng y cols., 1997
	rhesus sanos	única SN	Act locom, DA SN tamaño SN	Gash y cols., 1995
	Rhesus MPTP	única estriatal	Act mot, DA estr, TH+ SN	Gash y cols., 1996
	Rhesus MPTP	única SN/ caudado/ ventricular	Act mot, DA SN y pálido, tamaño SN, TH+ SN, fibras TH+	Gash y cols., 1996
Humanos	MPTP	ventricular	Clínica	Zhang y cols., 1997
	MPTP	ventricular	Act mot, DA y metabolitos en SN, no en putamen	Gerhardt y cols., 1999
Humanos	Enfermedad de Parkinson	ventricular	No mejoría, efectos secundarios	Kordower y cols., 1999
			No efectos AP	

estr: estriado; SN: sustancia nigra

**Métodos de evaluación del efecto neurotrófico:*

TH+: inmunoreactividad tirosina-hidroxilasa; DA: dopamina; rotación: respuesta rotatoria a agonistas dopaminérgicos; n° SN: número de neuronas en sustancia nigra; Act mot: actividad motora (acinesia, temblor, rigidez o inestabilidad postural en primates).

Efecto trófico dopaminérgico en roedores

Una inyección nigrica única de GDNF en ratas normales produce un incremento en la actividad motora, un crecimiento de fibras TH+ hacia el sitio de inyección, un aumento de la DA nigrica y un aumento de terminales estriatales TH+ (Hudson y cols., 1995). Los animales disminuyen de peso y bajó el consumo de agua y alimentos de manera transitoria. Una inyección intraventricular única en ratas sanas produce un aumento de DA en SN pero no en estriado (Martin y cols., 1996). En ratas (período postnatal 2) la inyección bilateral de GDNF estriatal produce un estado distónico y un incremento en los niveles de DA y serotonina mesencefálicos de un 60-100% (Beck y cols., 1996). En ratas viejas la administración de 10 microgramos de GDNF en nigra mejora parámetros de actividad locomotora y niveles de DA en estriado y accumbens a las 3 semanas (Hebert y cols., 1997). Administrando [125I]GDNF en ventrículo lateral de ratas sanas se puede apreciar, a las 24 horas, marcaje en córtex cerebral, septum, fimbria, estriado, hipocampo, hipotálamo, sustantia nigra/área tegmental ventral y cerebelo, permaneciendo en SN una semana más tarde. GDNF intraventricular produce un aumento de la DA estriatal (28%), nigral (40%) y en el hipotálamo (35%). Esto último puede explicar la pérdida de peso. Al día siguiente de la inyección intraestriatal de [125I]GDNF (0.1-100 µg) se observa el marcaje en SN y área tegmental ventral, confirmando pues que existe un transporte retrógrado (Lapchak y cols., 1997a).

Diversos experimentos evaluaron el efecto protector del GDNF en roedores, administrándolo antes del momento de la lesión del sistema nigroestriatal. GDNF intranigral e intraestriatal en ratones antes del MPTP protege de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de sus terminales y de la deplección de DA estriatal. Cuando lo administran después del MPTP se restauran los niveles de DA y la densidad de fibras. En ambos casos hay mejoría del comportamiento motor (Tomic y cols., 1995). Kearns y Gash en 1995 publicaron que la administración intranigral de GDNF disminuía la pérdida de inmunoreactividad TH en SN producida por administración de 6-OHDA estriatal o nigrica. Dosis de 3 mg/día en ratón durante 2 semanas protegen de la supervivencia tras axotomía y de la neurotoxicidad por 6-OHDA, aunque no de la disminución de inmunoreactividad a la TH en esas neuronas. Si se suspende el tratamiento a las 2 semanas las neuronas que habían sobrevivido degeneran. Este grupo cuantifica la potencia del GDNF en similar a la de la NT-4 y la del CTNF pero de 5 a 10

veces superior a la del BDNF (Lu y Hagg., 1997). GDNF administrado vía intraestriatal en ratas 24 horas antes de varias dosis de metanfetamina previene la reducción de DA estriatal cuando se evalúan estos parámetros una semana más tarde. La dosis de 1 μ g se mostró tan efectiva como la de 10 μ g (Cass, 1996). GDNF intranigral protege completamente de la toxicidad por 6-OHDA inyectada en SN cuando es administrado 6 horas antes del tóxico (no disminuye el número de neuronas nigrales). Esta protección disminuye a un 50% cuando ambas inyecciones se separan un tiempo de 12 a 24 horas. No hay efecto protector cuando se administra una hora antes de la 6-OHDA o de manera simultánea. En este experimento las ratas que recibieron GDNF nigral tenían unos niveles de DA estriatal y nigral en el lado lesionado dobles que las controles (Kearns y cols., 1997). GDNF intraestriatal e intracerebroventricular protege de la pérdida de neuronas nigrales marcadas con fluorogold inducida por 6-OHDA estriatal y de la disminución de neuronas nigrales TH+, pero no protege de la disminución de terminales TH+ en estriado (en relación con esto último puede estar el que no se aprecien diferencias en la tasa de rotación con anfetamina). La neurturina en este modelo no es efectiva por vía intraventricular y sus efectos, al ser administrada intraestriatalmente, son de menor cuantía que los del GDNF (Rosenblad y cols., 1998a).

El GDNF ha demostrado también efecto restaurador cuando es administrado tiempo después de la maniobra lesiva dopaminérgica. GDNF intranigral (dosis total 140 μ g) administrado durante 4 semanas, iniciándose el mismo día de la lesión con 6-OHDA, previene totalmente la muerte celular en SN mientras que TGF-beta 3 administrado de manera semejante no es efectivo en prevenir la degeneración celular ni la atrofia. Una única inyección de 10 μ g una semana postlesión tiene sólo un efecto parcial (Sauer y cols., 1995). GDNF infundido en SN disminuye la severidad de la rotación con agonistas dopaminérgicos en ratas lesionadas con 6-OHDA y aumenta la inmunorreactividad a la TH en las neuronas nigrales (Bowenkamp y cols., 1995). Inyectado en estriado antes o después de la inyección de 6-OHDA estriatal reduce de manera significativa el comportamiento rotatorio, la pérdida de fibras TH+ estriatales y de neuronas TH+ nigrales (Shults y cols., 1996). En ratas con lesión estable por 6-OHDA que recibieron una única inyección de GDNF (nigral o ventricular) se produce una disminución de la tasa de rotación por apomorfina. En el caso de la dosis intraventricular el efecto sólo duró 2-3 semanas. La dosis intranigral produce su efecto durante 11 semanas y un incremento en la actividad TH y en cantidad de DA nigral pero

no en estriado. En todos los animales se produjo retraso en la ganancia de peso (Lapchak y cols., 1997a). En ratas con lesiones bilaterales estables por 6-OHDA, la infusión de dos dosis de GDNF intraventricular (250 μ g a las 2 semanas y 500 μ g tres semanas más tarde), produce mejoría en actividad locomotora e incremento de neuronas con inmunotinción positiva a TH en nigra e incremento de DA en SN y área tegmental ventral, aunque no en estriado (Bowenkamp y cols., 1997). En ratas con lesión parcial, producida por 6-OHDA estriatal, en las que se realizó infusión estriatal de 5 μ g de GDNF en 10 ocasiones a lo largo de 3 semanas, se produjo una normalización de los parámetros motores y se recuperó un 80% de la innervación estriatal (Rosenblad y cols., 1998b). Con mini bombas osmóticas intraestriatales e intraventriculares, en ratas lesionadas con 6-OHDA, mejoran parámetros motores y disminuye la rotación inducida por anfetamina (Kirik y cols., 1998).

En roedores, ha demostrado también su acción trófica, vehiculizado mediante vectores virales que lo expresan y mediante implantes estriatales de GDNF encapsulados. Adenovirus codificantes de GDNF humano en sustancia nigra de rata protegen de la lesión por 6-OHDA estriatal: a las 6 semanas la pérdida de neuronas dopaminérgicas es tres veces menor (Choi-Lundberg y cols., 1997). En ratas que recibieron inyecciones perinigrales del virus codificante de GDNF 3 semanas antes de la infusión intraestriatal de 6-OHDA y que fueron sacrificadas 4 semanas más tarde, se comprobó que se preservaban mayor número de células nigricas y mayor número de células que expresaban TH que en controles. Además se vio que la expresión de GDNF permanecía estable a lo largo de diez semanas. El implante de adenovirus codificante para GDNF en ratón protege de la deplección de DA estriatal inducida por MPTP (Mandel y cols., 1997). Adenovirus codificante para GDNF, implantados en estriado 6 días antes protegen de la lesión por 6-OHDA (mayor número de neuronas nigrales y menor tasa de rotación que los animales controles) (Granholt y cols., 1997).

También se ha comprobado que favorece la innervación de transplantes. En modelos de transplante con células mesencefálicas en estriado de ratas, tanto la infusión con GDNF como el pretratamiento del tejido fetal con GDNF, mejoran la supervivencia del transplante (Oertel, 1998). Se realizaron en ratas transplantes de células fetales mesencefálicas pretratadas con GDNF en estriado y posteriormente se inyectó 6-OHDA en fascículo longitudinal medial y a los 10 y 28 días se realizaron infusiones estriatales de 10 μ g de GDNF (o salino). En ratas tratadas con GDNF aumentó el tamaño de las

células transplantadas y se produce mayor innervación alrededor del trasplante. GDNF, producido por células de riñón de hámster en polímeros encapsulados implantados cerca de fascículo longitudinal medial, protege de la pérdida de neuronas TH+ en SN y de la inducción de comportamiento rotacional en ratas sometidas a axotomía, una semana después de implantarse las cápsulas. No protege de la pérdida de DA estriatal, interpretando la mejoría en el comportamiento rotacional como secundario a ramificación dendrítica en SN. La dosis que liberan los implantes es de 5ng de GDNF/capsula-día (Tseng y cols., 1997).

Efecto trófico dopaminérgico en primates

El GDNF, marcado con I¹²⁵, inyectado en sistema ventricular, se acumula en ambas SN, en pared ventricular, corteza, cerebelo y médula. La inyección única de GDNF en sustancia nigra, en 6 monos rhesus sin lesión dopaminérgica, produjo, en 5 de ellos, pérdida de peso y en 4, un incremento significativo en los niveles de actividad diaria. Al sacrificarlos, a las 3 semanas, los niveles de DA en SN y área tegmental ventral se encontraron elevados de manera significativa (un 200% mayores que los de la nigra contralateral y que la de controles) y los de HVA en SN, área tegmental ventral y caudado. Las neuronas eran de un diámetro mayor en SN, en la zona adyacente a la infusión y mostraban un incremento de axones y dendritas TH+ (Gash y cols., 1995). Se ha demostrado que la inyección intraestriatal única de GDNF, en monos rhesus hemiparkinsonizados, produce un aumento persistente, durante varias semanas, de los niveles de DA en estriado, mejoría clínica y aumento del número de neuronas TH positivas (Gash y cols., 1996). Seis monos rhesus parkinsonizados con MPTP 3 meses antes, fueron tratados con inyección única de GDNF (2 intranigral, 2 intracaudado y dos ventricular). Durante las 4 semanas posteriores al tratamiento mejoraron bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural. Los tratados intraventricularmente recibieron tres inyecciones más y fueron sacrificados a las 3 semanas de la última. Los otros fueron sacrificados a las 4 semanas. Los niveles de DA en mesencéfalo y pálido eran dos veces más altos, las neuronas dopaminérgicas un 20% más grandes y con mayor densidad de fibras y se teñían más con TH (bilateralmente) que en monos controles. La deplección de DA inducida en caudado y en putamen no fue reversible con GDNF (Gash y cols., 1996). Administrado por vía intracerebroventricular, en monos con hemiparkinsonismo

estable (4 inyecciones intercaladas por un período de una semana), produce mejoría de bradicinesia, rigidez, postura y equilibrio cuando emplean dosis de 100, 300 y 1000 μg (no son efectivas las dosis de 10 y 30 μg). El efecto comienza a disminuir un mes tras la última inyección, salvo para la dosis de 300 μg , en los que la mejoría persiste. Los únicos efectos secundarios evidenciados fueron pérdida transitoria de peso y discinesias en uno de los animales que recibió la dosis mayor (Zhang y cols., 1997). GDNF intraventricular, a dosis de 100 y 450 μg , produce un aumento de DA en SN pero sólo de homovanílico en caudado y putamen. En primates, el cotratamiento con L-DOPA y GDNF intraventricular, produce una significativa mejoría de la clínica y disminuye la incidencia de efectos secundarios asociados al tratamiento con L-DOPA (vómitos, diskinesias, estereotipias y distonía). El único efecto secundario atribuido al GDNF es una pérdida transitoria de peso (Miyoshi y cols., 1997). Una inyección intraventricular única de 300 mg. de GDNF mejora a las 2-3 semanas la clínica parkinsoniana, la liberación de DA provocada por anfetamina y los niveles en SN de DA y sus metabolitos, pero no hay efecto en el putamen (Gerhardt y cols., 1999). No se ha publicado ningún estudio comparativo con la eficacia de otros FN o relacionándolo con variaciones en las imágenes PET.

En resumen, GDNF administrado por distintas vías ha demostrado, en modelos experimentales, una mejoría en actividad motora, en la tasa de rotación inducida por agonistas y en la presencia de neuronas y fibras con inmunotinción positiva a la TH. Sorprendentemente, en algunos experimentos (Hoffer y cols., 1994; Bowenckamp y cols., 1995 y 1997; Lapchak y cols., 1997; Gash y cols., 1995 y 1996), el incremento en los niveles de DA es significativo en SN pero no en estriado. El único efecto secundario evidenciado fue la disminución en la ganancia de peso.

Un ensayo clínico en pacientes con EP se inició en 1996 con GDNF intraventricular pero los resultados están pendientes de publicación. Únicamente se dispone de datos de un paciente que falleció, de causa no relacionada, a las tres semanas de la última inyección. Durante la fase abierta del estudio recibió 75, 150 y 300 unidades mensuales de GDNF pero su cuadro clínico continuó empeorando, con múltiples efectos secundarios (náuseas, anorexia, alucinaciones, depresión). En el análisis patológico no se evidenció ningún indicador de recuperación del sistema nigroestriatal: la inmunorreactividad a la TH en estriado y nigra era similar a pacientes

no tratados con GDNF (Kordower y cols., 1999). El estudio se ha suspendido por la aparición de efectos secundarios intolerables, entre otros, pérdida de peso y distonía.

C.7.d. FGF

Los roedores adultos expresan aFGF (FGF ácido o FGF 1) y bFGF (básico o FGF 2) en la sustancia nigra (Bean y cols., 1991; Cintra y cols., 1991; Tooyama y cols., 1992) y sus receptores están presentes en las neuronas estriatales y nigricas (Wanaka y cols., 1990; Asai y cols., 1993). Más tarde se observó que el bFGF es transportado de forma anterógrada por las neuronas nigroestriatales (Mc Geer y cols., 1992). El hallazgo de una disminución de los receptores para FGF en la sustancia nigra de los pacientes con enfermedad de Parkinson (Tooyama y cols., 1993) hizo pensar que éste era un mecanismo patogénico aunque no se puede saber si sólo es una consecuencia de la pérdida de las células nigroestriatales, en cuya membrana celular se localizan. La pérdida de neuronas inmunorreactivas a FGF2 disminuía en la EP hasta un 4% de lo normal, descenso mayor incluso que la disminución en el número de neuronas pigmentadas (a un 30% de lo normal).

bFGF pertenece a la familia de aFGF, queratinocito GF, FGF5 y 6, FGF3 (int2) y FGF 4 (hst 1). Tiene una estructura parecida a la interleukina 1. FGF es sintetizado y almacenado por la astrogliá regulando su diferenciación y proliferación in vitro. Su acción se manifiesta sobre neuronas colinérgicas, dopaminérgicas e hipotalámicas y sobre astrocitos. Induce a los astrocitos a sintetizar NGF. Tiene 4 receptores de alta afinidad (FGFR 1-4) que contienen un dominio intracelular de una tirosina kinasa. Cada subtipo puede mediar determinado papel en las acciones tróficas y se expresa más en determinadas áreas cerebrales y en ciertos tipos de neuronas. Mediante microinyecciones de 6-OHDA en SN se vio que, en las células gliales cercanas al tracto y a la zona de inyección, se producía un incremento en la cantidad del RNAm de los subtipos 1 y 2, pero no del 3 (Belluardo y cols., 1997). El subtipo 1 se expresa poco en estriado.

Entre sus mecanismos moleculares de actuación se encuentra la inhibición de la síntesis de una subunidad del receptor del glutamato tipo NMDA y el incremento de la síntesis de calbindina, una molécula que se encarga de modular un adecuado metabolismo del calcio. También aumenta la conexión en astrocitos (Rufer y cols.,

1996). Su acción no sólo es trófica sobre el sistema dopaminérgico: FGF promueve la diferenciación hacia neuronas glutamatérgicas de células progenitoras embrionarias de rata (Vaccarino y cols., 1995).

bFGF en concentraciones de nanogramos/c.c. es más potente diferenciador de las neuronas fetales mesencefálicas que BDNF o EGF. Produce mayor aumento en niveles de DA y en porcentaje de células TH+. En células de neuroblastoma humano (NB69), aFGF y, en menor medida, bFGF incrementan los niveles de DA, de NA y el número de células TH+. aFGF no puede testarse en células fetales mesencefálicas porque requiere heparina para su actividad y las células no crecen bien con esta sustancia (Mena y cols., 1995). aFGF junto a un coactivador induce la expresión de fenotipo dopaminérgico en neuronas estriatales en período de diferenciación activando la expresión del gen de la TH desde un estado quiescente (Du y Iacovitti, 1995). El cofactor puede ser una catecolamina como la DA, o un activador de las proteín-quinasas A o C. Esta activación se realiza vía fosforilación de la mitógeno- activate-proteín-kinasa (MAPK) y una serie de eventos en el sitio AP-1 del gen TH (Du y cols., 1997). EGF y bFGF estimulan el crecimiento de neuritas en cultivos de neuronas mesencefálicas de ratas, aumentando la captación de DA y la supervivencia ante MPP+, mediado a través de la proliferación glial que provocan. Para proteger, frente al MPP+, requieren que los factores hayan sido añadidos al cultivo 10 días antes, tiempo necesario para que se produzca suficiente crecimiento glial. La acción restauradora de toxicidad mediada por MPP+ se inhibe también evitando la proliferación glial con 5-fluoro-2-deoxiuridina (Park y Mytilineou, 1992).

En cultivos mesencefálicos de rata sin suero aFGF y bFGF aumentan en un 90% la supervivencia de neuronas TH+ a los 8 días de manera dosis dependiente. Los efectos de ambos factores no son aditivos y los sitios de captación de DA son incrementados sólo por bFGF. Ninguno de los dos factores produjo incremento en el tamaño de las neuritas (Engel y Bohn, 1991). bFGF incrementa la supervivencia de neuronas fetales y también postnatales de rata en cultivo (0.01-10 ng/ml) de manera dosis dependiente (hasta multiplicar por 10 respecto a controles), particularmente neuronas corticales. NGF fue sólo efectivo en neuronas postnatales septales y estriatales (Matsuda y cols., 1990). bFGF, pero no GDNF, protege a las neuronas dopaminérgicas in vitro de la toxicidad por 6-OHDA. Cuando se inhibe la proliferación glial o la síntesis de glutatión, se bloquea el efecto protector del bFGF (Hou y cols., 1997).

bFGF puede ser un factor endógeno mediando la plasticidad neuronal de neuronas DA frente a insultos como lo sugiere el que el tratamiento con interleukina 1B produzca un incremento selectivo del RNAm del bFGF en cultivos de astrocitos estriatales (no del aFGF ni del GDNF) (Ho y cols., 1997).

En la Tabla 10 se esquematizan resultados publicados en los que se empleó FGF en relación con el sistema dopaminérgico.

Tabla 10. Resumen de estudios con FGF en modelos de parkinsonismo en roedores y primates.

Modelo	lesión	vía	efecto*	
Ratón	MPTP	nígrica/ estriatal	DA, TH+	Otto y Unsicker, 1990
	MPTP	estriatal	DA, TH+	Date y cols., 1990
	MPTP	intraventricular	DA, DOPAC estriado	Schneider y Di Stefano, 1995
Rata	6-OHDA	estriatal	DA, DOPAC; actividad TH	Jin y cols., 1995
	6-OHDA	n DA fetales junto con FGF en estriado	rotación	Matsuda y cols., 1992
	6-OHDA	n DA fetales pretratadas con FGF en estriado	rotación; supervivencia TH + trasplante	Zeng y cols., 1996
	6-OHDA	neuronas nígricas fetales + fibroblastos productores de FGF	rotación, células TH +, volumen injerto supervivencia trasplante	Takayama y cols., 1995
Primates	MPTP	ventricular	Leve mejoría clínica; Hidrocefalia; No aumento células TH +	Pearce y cols., 1996
	MPTP	ventricular	18F-DOPA captación; clínica; neuronas TH+	de Yébenes y cols., 1998

estr: estriado; SN: sustancia nigra; n DA: neuronas dopaminérgicas

*Métodos de evaluación del efecto neurotrófico:

TH+: inmunoreactividad tirosin-hidroxilasa; DA: dopamina; neuroquímica; rotación: respuesta rotatoria a agonistas dopaminérgicos; Act mot: actividad motora - acinesia, temblor, rigidez o inestabilidad postural.

Efecto trófico dopaminérgico en roedores

Tanto el FGF ácido como básico, revierten los déficits bioquímicos y conductuales en roedores (Date y cols., 1990; Otto y cols., 1990). Otto y Unsicker en 1990 publicaron que la implantación de un gel tratado con FGF 2, en estriado de ratón lesionado con MPTP, producía un incremento en niveles de DA y de inmunorreactividad a la TH en ambos estriados. Esto ocurría tanto si se administraba simultáneamente con el MPTP como 8 días después. Posteriormente se vio que

demorando el inicio del tratamiento hasta 4 semanas post-MPTP se perdía la efectividad (Otto y Unsicker, 1994). En ratón joven lesionado con MPTP, pero no en el adulto, se objetivaba recuperación del sistema dopaminérgico nigroestriatal tras inyección estriatal de aFGF a los días 2, 7 y 12 post-MPTP. En los animales de dos meses se producía aumento de DA y de inmunorreactividad TH pero no en los de doce meses (Date y cols., 1990). bFGF no protege in vitro de la toxicidad por MPTP pero in vivo, en ratones, protege de la pérdida de DA estriatal y de TH. Esto puede ser explicado por diferente composición glial o por distinta expresión de receptores en animales en crecimiento y en adultos.

En ratas lesionadas con 6-OHDA, aFGF administrado en estriado, disminuye la severidad de rotación con anfetamina, mejora la actividad TH estriatal y los niveles de DA y DOPAC (Jin y Iacovitti, 1995). FGF2 intraventricular restaura los niveles de DA y DOPAC en estriado pero no protegió de la deplección de neuronas TH+ nigrales. También fue efectivo el GM1 intraperitoneal y cuando se combinan ambos tratamientos el efecto se potenció (Schneider y Di Stefano, 1995). El FGF aumenta la inmunotinción de neuronas nígricas con anticuerpos contra TH (Kordower y cols., 1993). También se ha estudiado el papel del FGF en la mejora de resultados de trasplantes. Matsuda y col. (1992) objetivaron que añadir FGF a neuronas dopaminérgicas fetales, implantadas en estriado de ratas hemiparkinsonizadas a dosis de 5 (pero no de 50 ng), potenciaba la recuperación del comportamiento rotacional. Se ha comprobado que favorece la inervación, acelera la recuperación motora, aumenta el número de células TH + y aumenta el volumen del injerto, cuando se implanta mesencéfalo fetal tratado con FGF, y no con NGF, en estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. El efecto es proporcional al incremento en tinción GFAP, lo que sugiere la mediación de la proliferación glial (Zeng y cols., 1996). Cotransplantes de fibroblastos modificados para producir bFGF con neuronas nígricas fetales en ratas hemiparkinsonizadas incrementa significativamente el número de neuronas supervivientes en el estriado transplantado (Takayama y cols., 1995). Haque y cols. (1995) usaron células de Schwann inmortalizadas y modificadas genéticamente para secretar kFGF en los cotransplantes pero no consiguieron mejoría en la supervivencia. IGF y bFGF tienen efectos aditivos en potenciar la supervivencia y disminuyen la apoptosis de células transplantadas (Zawada y cols., 1996). Células progenitoras aisladas del SNC humano fueron inducidas a dividirse por FGF y EGF y

pueden ser mantenidas en estado proliferativo en cultivo. Algunas fueron transplantadas en estriado de ratas con lesión dopaminérgica unilateral. A las 20 semanas sólo sobrevivían unas pocas neuronas humanas, algunas de ellas totalmente diferenciadas y mostrando inmunotinción positiva para TH, y muchas células progenitoras se habían diferenciado a astrocitos que se encontraban dispersos por el estriado. Algunos animales mejoraron comportamentalmente (Svendsen y cols., 1997).

Efecto trófico dopaminérgico en primates

FGF intraventricular en infusión continua (a dosis 1, 8, 18 o 180 µg por litro) en titís, iniciándose 10 semanas tras el MPTP, no produjo mejoría en déficits motores salvo en tres de los 5 animales tratados con mayores dosis. Tampoco se objetivaron diferencias en el número de neuronas nigricas TH. Todos los que recibieron la dosis mayor, tenían hidrocefalia, debido a proliferación del epéndimo y de los plexos coroides (Pearce y cols., 1996).

Nuestro grupo ha encontrado recientemente, en monos hemiparkinsonianos, una elevación de captación de 18F-DOPA, tras la infusión de FGF, mejoría de la conducta, aumento de la inmunorreactividad a la TH y disminución de las alteraciones histológicas. La dosis empleada fue de 2 µg vía ventricular en un volumen de 200 µl durante un período de 6 meses, produciendo un incremento de captación de fluoro-DOPA en la PET, respecto a la realizada antes de comenzar el tratamiento, de un 400% en estriado ipsilateral a la lesión y de un 200% en el lado contrario, llegando a superar niveles normales. El número de neuronas TH + en nigra se correlacionó de manera positiva con la captación en la PET (De Yébenes y cols., 1998).

C.7.e. Medio condicionado por glía (MCG)

Las células gliales producen diversos compuestos que han demostrado tener efecto protector de las neuronas dopaminérgicas, influyendo en su crecimiento, supervivencia y en la extensión de sus neuritas, así como en la resistencia frente a agentes neurotóxicos. Las neuronas de la sustancia nigra tienen, proporcionalmente, poca glía alrededor que pueda protegerlas del estrés oxidativo, por lo que pueden ser más vulnerables a la acción de neurotoxinas. El mecanismo a través del cual la glía ejerce el papel trófico, incluye secreción de pequeñas moléculas antioxidantes (Damier y

cols., 1993; Slivka y *cols.*, 1987) y de péptidos neurotróficos (Engle y *cols.*, 1991; Lin y *cols.*, 1993; Nagata y *cols.*, 1993; Hoffer y *cols.*, 1994; Takeshima y *cols.*, 1994 a,b; Muller y *cols.*, 1995). Hay distintos tipos celulares gliales implicados: oligodendrocitos, progenitores de los astrocitos tipo 2 (O2-A), microglía y los astrocitos tipo 1 y 2. Los astrocitos tipo 1 producen factores tróficos que son selectivos para neuronas dopaminérgicas. Los efectos neurotóxicos del H₂O₂ son menores en neuronas de ratón cocultivadas con astrocitos. Este efecto protector de los astrocitos parece implicar, sobre todo, la acción de la catalasa, mientras que en las neuronas, la acción de la glutatión peroxidasa es la fundamental contra la toxicidad del H₂O₂. La protección varía en función del número de astrocitos respecto al de neuronas en el cultivo (Desagher y *cols.*, 1996). Se han realizado cotransplantes de neuronas fetales de mesencéfalo ventral de ratas junto con astrocitos en estriado denervado de rata, evaluándose a los 5-6 meses mediante autorradiografía, una mayor captación de 3H-DA en ratas que habían recibido los cotransplantes con astrocitos estriatales frente a transplantes únicos de neuronas o junto a astrocitos de otras localizaciones. También se realizaron los transplantes sobre estriados intactos y, a los 3-6 meses, cuando se empleó el cotransplante de neuronas junto a astrocitos estriatales, se observó una inmunorreactividad a TH más uniforme y un tamaño de los cuerpos celulares TH+ significativamente mayor. Se comprobó que los astrocitos neonatales estriatales tienen un efecto trófico sobre el pericaria de DA y un efecto trópico sobre los axones DA (Pierret y *cols.*, 1998).

Los oligodendrocitos (tipo 2) y progenitores astrocíticos (O-2A) aumentan la supervivencia de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas fetales de rata sujetas a privación de suero (O'Malley y *cols.*, 1992,1994). El medio condicionado obtenido de cultivos de progenitores O2-A previene la desaparición de neuronas inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa (Takeshima y *cols.*, 1994 a,b). El medio condicionado por microglía favorece el crecimiento y desarrollo de neuronas mesencefálicas embrionarias de rata (Nagata y *cols.*, 1993). El medio condicionado por glía favorece el crecimiento y diferenciación de neuronas DA in vitro (Engle y *cols.*, 1991).

La ausencia de elementos protectores secretados por las células gliales puede condicionar que la L-DOPA, principal tratamiento de la EP, sea tóxica en experimentos in vitro. Eso podría explicar la discrepancia con los resultados de experimentos in vivo, en los que, salvo en dos excepciones (Blunt y *cols.*, 1993; Fukuda y *cols.*, 1996), no se ha podido demostrar el efecto tóxico de la L-DOPA. Recientemente, incluso se ha

demostrado que la L-DOPA promueve la recuperación parcial de marcadores dopaminérgicos en ratas con lesiones nigroestriatales moderadas (Murer y cols., 1998). In vitro, la glía mesencefálica produce factores solubles que protegen a las neuronas DA de la toxicidad por L-DOPA (Mena y cols., 1996). La L-DOPA, en cultivos de neuronas mesencefálicas fetales, disminuye el número de células viables, la arborización neurítica, la captación de [3H] DA y el número de neuronas TH positivas. La toxicidad in vitro por L-DOPA se asocia a una elevación de los niveles de quinonas. Cuando se coadministra MCG se normaliza el número de células viables, su arborización y la captación de [3H] DA, así como los niveles de quinonas. Incluso el número de neuronas TH positivas se incrementa a un 170% de los tratados con vehículo. El MCG no sólo incrementa el número de neuronas TH+ en cultivos tratados con L-DOPA sino que aumenta también en los controles por lo que se piensa que es trófico para células DA. La protección asociada a la disminución de quinonas puede sugerir que el mecanismo de actuación del medio condicionado sea el reducir la cantidad de productos oxidativos citotóxicos (Mena y cols., 1997). En cultivo también se ha podido demostrar que, cuando hay glía, la L-DOPA induce la síntesis de glutathione (Han y cols., 1996).

El MCG posiblemente ejerce un papel neuroprotector por el efecto de varios compuestos, aunque la fracción de bajo peso molecular es la más activa (Mena y cols., 1997). Esta fracción contiene factores antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutathione, y la de mayor peso molecular contiene los péptidos neurotróficos entre los que previsiblemente se encontrarán FGF y GDNF. De las sustancias presentes en el MCG, el glutathione, un compuesto cuyo contenido está disminuido en la sustancia nigra de pacientes con EP (Sian y cols., 1994), parece el candidato más firme a un protagonismo neuroprotector.

Otros experimentos in vitro sugieren, sin embargo, que la glía puede ser la mediadora de procesos deletéreos para las neuronas dopaminérgicas como la secreción de citokinas con acción citotóxica (IL-1, IFN- γ , TNF- α) que provocan apoptosis y un incremento en la producción de nitritos (Hirsch y cols., 1998 a y b). No obstante, estas citokinas también han demostrado, por otro lado, acciones neurotróficas, por lo que el balance final en los procesos patogénicos in vivo queda aún por determinar.

Por todo lo anteriormente referido, el MCG podría ofrecer futuros avances en la terapia de la EP. Para ello es imprescindible confirmar sus efectos tróficos en experimentos in vivo.

C.7.f. Otros factores dopaminérgicos

Son muchos los factores ensayados previamente en distintos modelos animales de degeneración dopaminérgica (Tabla 11).

Las neurotrofinas son una familia de citocinas esenciales en el crecimiento y supervivencia de las neuronas colinérgicas, dopaminérgicas y noradrenérgicas del SNC y de neuronas simpáticas y sensoriales del SNP (Arenas y cols., 1994; Snider y cols., 1994). Cinco proteínas, estructural y funcionalmente semejantes, constituyen esta familia: NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 y NT-6. Son homodímeros. Su gen ha sido cartografiado en el cromosoma 11 en el humano y en el cromosoma 2 en el ratón (Ozcelik y cols., 1991). Un precursor proteico grande es procesado proteolíticamente obteniéndose distintas neurotrofinas (Serrano-Sánchez y Díaz- Armesto, 1998). Todas se unen a un receptor común de baja afinidad (LNGF-R) pero todas tienen distintas acciones sobre receptores de alta afinidad. El NGF actúa a través del trkA, el BDNF y las NT 4 y 5 a través de trkB y NT3 mediante trk C.

NGF fue el primer FN identificado. Su acción es predominante sobre neuronas simpáticas y sensitivas. Astroцитos modificados para expresar el gen NGF mejoran transplantes estriatales de células cromafines (Cunningham y cols., 1991). En ratas lesionadas con 6-OHDA, infundidas con NGF, disminuye la tasa de rotación y en ratones lesionados con MPTP, implantados con células PC12 condicionadas para secretar NGF, revierte la pérdida de neuronas TH+ (Pezzoli y cols., 1988; Chen y cols., 1996). Ni BDNF ni bFGF ni IGF son tan potentes en promover la diferenciación dopaminérgica como el NGF sobre neuronas simpáticas periféricas o colinérgicas mesencefálicas. (Beck y cols., 1993 y 1994).

BDNF es una proteína dimérica de 247 aminoácidos (un homodímero de 27kDA) producido por células gliales. Es poco inmunogénico y tiene un alto grado de conservación a través de las especies. El ARNm del BDNF se expresa en casi todas las regiones cerebrales, encontrándose los niveles más elevados en hipocampo y corteza cerebral. También se expresa en otros tejidos como corazón, pulmones, riñones y

plaquetas (Scarisbrick y cols., 1993). Durante el período de desarrollo del cerebro de ratas hay un gradiente en la expresión del ARNm del BDNF, indicando su relación con la maduración neuronal (Friedman y cols., 1991). Para realizar su función se une a productos del gen *trkB* de la familia *trk* de receptores de tirosina-quinasa (Squinto y cols., 1991). Aunque las funciones del BDNF no han sido bien definidas a nivel central, se postula que es capaz de promover la supervivencia y crecimiento de neuronas sensoriales derivadas de la placa y de la cresta neural (Sieber-Blum y cols., 1991) y de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (Alderson y cols., 1990). Sobre neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral aumenta el número de neuronas positivas para la TH (Hyman y cols., 1991) y protege frente a la toxicidad por 6-OHDA y por MPTP, a través de la reducción del estrés oxidativo celular, probablemente por inducir la regulación de las enzimas involucradas en la disipación de los radicales libres y el anión superóxido (Spina y cols., 1992). La administración oral de L-DOPA aumenta la expresión del RNAm del BDNF (Okazawa y cols., 1992). BDNF en cultivos de láminas de mesencéfalo de ratas en período postnatal produce un incremento de la supervivencia de neuronas TH y, en cocultivos estriatales, un aumento de la densidad de fibras TH (Ostergaard y cols., 1996). Induce también crecimiento de neuronas parasimpáticas de la raíz dorsal, neuronas GABAérgicas, serotoninérgicas y motoneuronas espinales y craneales. BDNF inyectado en estriado es transportado retrógradamente (Anderson y cols., 1995) y se observa BDNF en SNpc y área ventral tegmental (Gall y cols., 1992). Fibroblastos modificados genéticamente para sintetizar BDNF implantados en tegmento mesencefálico disminuyen la pérdida de neuronas provocada por infusión estriatal de MPP+ (Frim y cols., 1994). Inyectado en estriado, protege de la inyección estriatal de 6-OHDA: reduce de manera significativa el comportamiento rotatorio, la disminución de fibras TH+ estriatales y las neuronas TH nírgicas (Shults y cols., 1995). BDNF es un mediador de los efectos tróficos de PDGF y del bFGF en células hipocampales. Astroцитos transfectados retroviralmente para producir BDNF protegen de la lesión por 6-OHDA en cultivo. Astroцитos jóvenes con BDNF cotransplantados no reducen la supervivencia de los trasplantes mesencefálicos en ratas pero sí los astroцитos maduros (Krobert y cols., 1997).

Aunque BDNF claramente ha demostrado ser capaz de incrementar la supervivencia y la actividad de las neuronas dopaminérgicas, aún no se ha demostrado que pueda inducir desarrollo de axones colaterales desde neuronas supervivientes en

modelos de parkinsonismo (Yurek y cols., 1996). Lucidi-Phillipi (1995) publicaron que fibroblastos que sintetizan BDNF, implantados en SN de ratas normales, sí que inducen el crecimiento de ramificaciones hacia el trasplante. En 3 monos japoneses la infusión intratecal continua de BDNF previno el desarrollo de clínica parkinsoniana inducida por MPTP intravenoso y la pérdida de neuronas dopaminérgicas evaluadas a las dos semanas del inicio del experimento (Tsukahara y cols., 1995).

Dado que BDNF y NT 4/5 actúan a través del mismo receptor, no es sorprendente que los resultados experimentales sean semejantes. La infusión intraestriatal de NT 4/5 (pero no NT3) en ratas hemiparkinsonizadas que habían recibido implantes de neuronas dopaminérgicas embrionarias disminuía el comportamiento rotacional y favoreció el crecimiento de fibras desde los trasplantes (Haque y cols., 1996). NT 3 y BDNF recuperan el comportamiento rotacional e incrementan los niveles de DA y serotonina en un modelo de lesión parcial del sistema dopaminérgico (Altar y cols., 1994). NT 3 mantiene la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y gabaérgicas en cultivos de células mesencefálicas de rata (Hyman y cols., 1994).

Otros factores gliotróficos, además del FGF, incluyen los factores de crecimiento epidérmico (EGFs), el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor que transforma crecimiento (TGF), el factor inhibidor de leucemias/factor de diferenciación colinérgica (LIF/CDF), interleucinas y gangliósidos.

EGF infundido por vía intraventricular en ratones lesionados con MPTP produce un aumento de DA, de DOPAC y de la actividad TH en estriado (Hadjiconstantinou y cols., 1991). Mejora el número de neuronas TH en SN en la rata sometida a axotomía (Ventrella, 1993). En monos hemiparkinsonizados por MPTP, nuestro grupo realizó infusión intraventricular durante 6 meses, continuando el empeoramiento clínico como ocurría en controles. En el PET con 18F-DOPA se produjo una disminución de la captación de un 60% respecto al previo al tratamiento y anatómicamente se apreció leve hidrocefalia, por lo que, comparando con los beneficiosos resultados obtenidos con FGF, se desestimó el proseguir experimentos con EGF (De Yébenes y cols., 1998).

El PDGF es crucial para la adecuada mielinización del SNC en desarrollo (Richardson y cols., 1988). Los astrocitos tipo1 producen PDGF e inducen la mitogénesis y la diferenciación de progenitores astrocíticos (O-2A) a oligodendrocitos y astrocitos tipo 2. PDGF promueve la división de los progenitores oligodendrocíticos y

parece ser que la salida del ciclo celular y la diferenciación a formas maduras se relaciona con un decremento en la actividad PDGF. La sobreexpresión de este factor en ratones transgénicos conduce a una excesiva proliferación de oligodendrocitos que no llegan a una maduración completa (Calver y cols., 1998). En células mesencefálicas en cultivo ha demostrado resultados contradictorios: unos experimentos evidenciaron que mejora la supervivencia celular (Nikkhah y cols., 1993) pero otros no encontraron que influenciara en la degeneración neural (Engle y cols., 1991).

GDF5 (growth differentiation factor 5) es un nuevo miembro de la superfamilia del TGF con efecto sobre neuronas dopaminérgicas in vitro. Cuando las células son pretratadas con GDF5 mejora la supervivencia de los trasplantes mesencefálicos en estriado de rata, previene el desarrollo de rotación inducida por anfetamina, mejora la funcionalidad de las terminales dopaminérgicas cuantificada mediante PET, el número de células TH mesencefálicas y los niveles de DA en estriado (Sullivan y cols., 1997 y 1998).

LIF/CDF (leucemia inhibitor factor/cholinergic differentiation factor) es otro factor dopaminérgico. LIF incrementa el número de células que expresan TH, los niveles de DA, de transportador de DA y de dopa decarboxilasa cuando se añaden a cultivos de células progenitoras neurales de rata (Ling y cols., 1998).

El gangliósido GM1 administrado vía intraperitoneal, así como FGF2 intraventricular, restauran los niveles de DA y DOPAC en estriado. Cuando se combinan ambos tratamientos el efecto se potencia. GM1, pero no FGF ni EGF, permitió una protección de las neuronas TH nigrales (Schneider y cols., 1995). GM1 administrado intraperitonealmente en ratón una vez al día durante 3 semanas (iniciándose 24 horas tras la última inyección de MPTP), restauró parcialmente los niveles de DA estriatales y rescató neuronas de la SN. Selegilina a dosis altas, administrado de igual manera, incrementó el nivel de DA estriatal pero no fue capaz de evitar la degeneración celular en la SN. Administrados ambos tratamientos, se potenció su acción (Rothblat y cols., 1998).

MPF (melanotropin potentiating factor) es otro factor que promueve el crecimiento en cultivos de neuronas mesencefálicas (Owen y cols., 1997). La melatonina (vía intraperitoneal) ha demostrado ser un protector efectivo de la toxicidad por MPTP en ratón: revierte el incremento en la peroxidación lipídica y la pérdida de terminales estriatales TH+ (Acuña Castroviejo y cols., 1997). Ara C previene de la

muerte por apoptosis, específicamente a las neuronas dopaminérgicas en cultivos mesencefálicos. Ara C sólo entra en los núcleos de los astrocitos, sugiriendo que su acción neurotrófica es mediada por el efecto antiproliferativo de la glía y sin encontrarse secreción de ningún factor por lo que se piensa que es debido a interacciones neurogliales (Michel y cols., 1997).

Las neuroinmunofilinas son factores en los que se centraron muchas expectativas futuras en la terapia de enfermedades degenerativas, ya que atraviesan BHE y se podrían administrar por vía periférica. Se expresan en el sistema nervioso central a niveles tan altos como en el sistema inmune, colocalizan con calcineurina y se unen a receptores denominados ciclofilinas y FKBP. Actúan a través de inhibir la excitotoxicidad mediada por glutamato. Ciclosporina A, FK 506 y rapamicina son fármacos con propiedades inmunosupresoras, pero se están buscando análogos que mantengan sus propiedades tróficas sin el efecto depresor inmune. Añadidos a cultivos de células PC12 y de neuronas del ganglio dorsal, incrementan el crecimiento de neuritas (Steinert y cols., 1997a). Ciclosporina A intraperitoneal, incrementa la actividad motora en ratas lesionadas con 6-OHDA (Borlongan y cols., 1996). Protege de la deplección de DA y ácido homovanílico en estriado y de la disminución de HVA y DOPA en SN en ratón lesionado con 6-OHDA (Matsuura y cols., 1996) y mejora el número y volumen de células mesencefálicas transplantadas en ratas hemiparkinsonizadas con 6-OHDA (Galpern y cols., 1996). GPI-1046 es, incluso, un producto más prometedor porque es más potente, no es inmunodepresor y es efectivo por vía oral. Administrado vía intraperitoneal en ratones MPTP (tanto antes como después de la neurotoxina) y en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA, incrementa la recuperación del sistema dopaminérgico, disminuye el número de rotaciones, previene de la deplección de DA e incrementa densidad de terminales TH+ (Steinert y cols., 1997b).

Tabla 11. Resumen de estudios con otros FN en modelos de parkinsonismo en roedores y primates.

Factor	Modelo	lesión	vía	efecto	
NGF	Rata	6-OHDA	transplantes estriatales de células cromafines + astrocitos expresando gen NGF	DA, TH+	Cunningham y cols., 1991
	Rata	6-OHDA	estriatal	rotación	Pezzoli y cols., 1988
	Ratón	MPTP	células PC12 secretan NGF	neuronas TH+	Chen y cols., 1996
BDNF	Rata	MPP+ estriado	Fibroblastos que sintetizan BDNF implantados en tegmento mesencefálico	disminuyen la pérdida de neuronas provocada	Frim y cols., 1994
	Rata	sanas	infusión nigrica y estriatal	rotación, DOPAC, HVA	Altar y cols., 1992
	Rata	6-OHDA	estriado	rot, fibras TH+ neuronas TH nigricas	Shults y cols., 1995
	Rata	6-OHDA	astrocitos	rotación	Yoshimoto y cols., 1995
	Rata	6-OHDA	infusión	rotación	Yurek y cols., 1996
	Rata	sana / 6-OHDA	fibroblastos que sintetizan BDNF en SN o estriado	crecimiento de ramificaciones, metabolismo DA	Lucidi-Phillipi y cols., 1995
	Rata	6-OHDA	cotransplante tejido mesencefálico+ astrocitos BDNF	supervivencia del transplante	Krobert y cols., 1997
	Primates	MPTP	infusión intratecal continua	clínica, neuronas TH+	Tsukahara y cols., 1995
NT3	Rata	6-OHDA	estriatal	rotación, DOPAC y 5-HIAA	Altar y cols., 1994 o 93
NT4/5	Rata	6-OHDA	neuronas dopaminérgicas embrionarias + NT4/5 estr	rotación, crecimiento de fibras desde los transplantes	Haque y cols., 1996
EGF	Ratón	MPTP	intraventricular	DA, de DOPAC y de la actividad TH	Hadjiconstantinou y cols., 1991
	Rata	axotomía	intraventricular	SN TH+, terminales TH+, rotación	Pezzoli y cols., 1991
	Rata	axotomía	intraventricular	SN TH+, terminales TH+, rotación	Ventrella, 1993
	Primates	MPTP	intraventricular	No mejoría clínica ni e 18-F-DOPA PET; hidrocefalia	De Yébenes y cols., 1998
CNTF	Rata	axotomía	infusión	TH+	Hagg y cols., 1993
IL-1	Rata	6-OHDA	implante (polímeros)	rotación	Wang y cols., 1994
GDF5	Rata	6-OHDA	transplantes mesencefálicos tratados	supervivencia transplante, rotación, células TH+, [11C]RTI-121PET	Sullivan y cols., 1998
GM1	Ratón	MPTP	intraperitoneal	DA y DOPAC en estriado, neuronas TH nigrales	Schneider y cols
	Ratón	MPTP	intraperitoneal	DA estriatal y neuronas de la SN	Rothblat y cols., 1998
Melaton.	Ratón	MPTP	intraperitoneal	peroxidación lipídica; terminales estriatales TH+	Acuña Castroviejo y cols., 1997
CsA	Rata	6-OHDA	intraperitoneal	actividad motora	Borlongan y cols., 1996
	Ratón	6-OHDA	intraperitoneal	DA y HVA en estriado; HVA y DOPA en SN	Matsuura y cols., 1996
	Rata	6-OHDA	neuronas mesencefálicas + CsA intraperitoneal	número y volumen de células	Galpern y cols., 1996
GPI-1046	Ratón	MPTP	intraperitoneal	neuronas TH, previene deplección de DA	Steinert y cols., 1997
	Rata	6-OHDA	intraperitoneal	densidad de terminales TH+, rotación, DA estriatal	Steinert y cols., 1997

CsA: ciclosporina A; estr: estriado; SN: sustancia nigra; n DA: neuronas dopaminérgicas; Melaton.: melatonina.

Métodos de evaluación del efecto neurotrófico: TH+ inmunorreactividad tirosin-hidroxilasa; DA: dopamina, neuroquímica;

rotación: respuesta rotatoria a agonistas dopaminérgicos; Act mot: actividad motora (acinesia, temblor, rigidez o inestabilidad postural en primates).

C.8. Factores neurotróficos en otras alteraciones del sistema nervioso

Existe un modelo de neuropatía periférica en roedores causado por déficits de neurotrofinas. El RNAm de NGF, BDNF, CNTF y LIF/CDF aumenta tras lesiones de nervio en modelos experimentales. Estos factores protegen de la lesión en animales neonatos. NGF ha demostrado, en animales de experimentación, proteger del desarrollo de neuropatía sensitiva diabética. El NGF también disminuye las alteraciones en microtúbulos y frena el desarrollo de neuropatía tóxica por taxol, vinblastina o cisplatino. Se ha usado en tres pacientes en Suecia. Los efectos beneficiosos son discretos pero la infusión ha sido suspendida por efectos secundarios, entre otros pérdida de peso e hiperpatía (Nordberg A, comunicación personal al director de la tesis). Por su acción sobre neuronas colinérgicas se plantea su uso en enfermedad de Alzheimer. Otra patología en la que puede ser eficaz es en la disautonomía familiar porque se ha asociado a un déficit de NGF.

CNTF previene la degeneración de neuronas axonotomizadas en el ratón neonato. En humanos no parece que intervenga en enfermedades neurológicas porque una mutación del gen del CNTF se encuentra por igual en población sana que enferma. Tiene además corta vida media y produce elevación de enzimas hepáticas. Se realizó un estudio con CTNF en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica pero empeoraron más que el control. El RNAm de LIF se expresa en músculo tras axonotomía e *in vitro* demostró promover la supervivencia de motoneuronas espinales. GDNF en motoneuronas previene la muerte neuronal programada y la provocada por axonotomía, atenúa la disminución de colinacetiltransferasa inducida por axonotomía y protege de la excitotoxicidad por glutamato.

En enfermedad cerebrovascular, los estudios se han centrado sobre todo en el FGF. La inyección intracisternal de bFGF bisemanalmente (0.5 µg/inyección) produce recuperación sensitivo motora en ratas con infarto en territorio de la cerebral media durante el primer mes tras el infarto. Se observó un incremento en la inmunotinción a GAP-43 (growth-associated protein 43), un marcador de crecimiento axonal, en el córtex contralateral tras el tratamiento con bFGF (Kawamata y cols., 1997). Se ha realizado un ensayo con FGF en humanos basado en buenos resultados en modelos experimentales. El ensayo clínico fue suspendido por un exceso de mortalidad en el grupo tratado.

En pacientes afectados de ataxias espinocerebelosas y en modelos animales de esta enfermedad se han descrito niveles descendidos de IGF-I. Al mes del tratamiento en roedores se produce, neurofisiológicamente, restablecimiento de conexiones olivocerebelosas y, clínicamente, recuperación de coordinación. Aún no se ha ensayado en humanos. En esclerosis múltiple se plantean diversos factores implicados: PDGF, FGF2, NT3, CNTF, LIF.

D. Métodos de evaluación de la evolución de la enfermedad de Parkinson.

Con la terapia con factores neurotróficos se pretende, más que una mejoría sintomática inicial, un cambio en la historia natural de la enfermedad, frenar la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas y la evolución del trastorno clínico. Pero, al ser una enfermedad de larga evolución, con distinto grado de severidad y de velocidad de progresión en cada paciente, medir la efectividad de una intervención protectora o restauradora es complicado.

Las técnicas de neuroimagen funcional (PET, SPECT, espectroscopía) permiten detección de alteraciones subclínicas, cuantificar la progresión de una enfermedad y evaluar la activación mediante estímulos motores o cognitivos de distintas áreas cerebrales. El PET, que es la más sensible, permite demostrar la distribución regional de radionucleidos emisores de positrones dentro del cerebro vivo. El desarrollo de esta metodología ha permitido la cuantificación de índices fisiológicos como el flujo sanguíneo cerebral, el metabolismo del oxígeno, de la glucosa o de la DOPA. Igualmente se han definido patrones metabólicos característicos de distintos cuadros.

Los estudios con oxígeno [$^{15}\text{O}_2$] en pacientes con hemiparkinsonismo, objetivaron un incremento del 13% en flujo sanguíneo y de la utilización de oxígeno en los ganglios basales contralaterales al lado sintomático, cuya interpretación es difícil. En pacientes con sintomatología bilateral se observó un decremento bilateral en ambos parámetros de manera difusa en todo el cerebro (Wolfson y cols., 1985).

Con radioligandos de receptores de dopamina (raclopride, espiperona) y opiáceos (diprenorfina) se pueden observar cambios en los receptores de las neuronas estriatales. La concentración de receptores D2 en estriado en la EP es normal o incluso aumentada en EP de novo, mientras que se encuentra disminuida en pacientes tratados, con respuesta fluctuante a la L-DOPA, y en casos de enfermedad muy avanzada así

como en pacientes con degeneración estriato nigrica y en la PSP (Brooks y cols., 1992). En la PSP se ha descrito disminución de receptores de encefalinas (Burn y cols., 1995) y disminución de receptores D2 en caudado y putamen (Leenders y cols., 1986; Brooks y cols., 1990, 1992).

El estado del sistema presináptico nigroestriatal puede cuantificarse utilizando PET con 18F-DOPA, PET con 11C nomifensina o trazadores basados en tropano como C123 Beta CIT para ver sitios de captación de la dopamina o valorando el transporte de DA en vesículas mediante el PET con 11C dihidro tetrabenazina. Otros trazadores recientemente empleados para el estudio de función dopaminérgica incluyen el 6-[18F]fluoro-L-m-tirosina (Jordan y cols., 1997).

El análogo de la DOPA 6-fluorodopa marcado con el emisor de protones F18, se ha visto que se acumula en áreas del cerebro ricas en dopamina, pudiéndose emplear como marcador del componente presináptico del sistema nigroestriatal. Se administra 18F-DOPA vía intravenosa que es transportada a través de la BHE de manera semejante a la L-DOPA, formándose fluorodopamina (FDA) por acción de la L aromático decarboxilasa en las terminales nigroestriatales. Ésta se acumula en vesículas en las terminales de las neuronas nigroestriatales y sufre “atrapamiento”, no metabolizándose. Aunque teóricamente la FDA estriatal podría metabolizarse a HVA y dihidroxifenilacético marcados, estos metabolitos no se detectan en sangre, al menos a las 3 horas de la administración de la 6-FD, ni tampoco se detectan en LCR fluoro homovanílico ni fluoro DOPAC. La actividad de fondo en el cerebro disminuye con el tiempo mientras que la actividad en estriado se mantiene constante desde los 60 hasta los 120 minutos. La actividad de fondo se cree que es 6-F-DOPA que ha atravesado la BHE por el sistema de transporte de aminoácidos neutros y 3-OM-6FDOPA producida en la periferia por la COMT. La actividad en estriado que excede de la actividad de fondo (que se considera medida en cerebelo o en occipital) es la radiactividad debida únicamente a la 6-FDA, es un índice de la síntesis y atrapamiento de la FDA. Una disminución de la captación estriatal implica pues un defecto en la síntesis de DA o un defecto en su almacenamiento o en actividad DOPA decarboxilasa. No mide DA endógena ni capacidad de formación desde precursores endógenos.

Los datos se recogen en cortes transaxiales (dos dimensiones) aunque los más recientes permiten análisis en tres dimensiones pero a costa de mayor actividad de fondo. Se comparan índices de captación en zonas dopaminérgicas con otras regiones

cerebrales neutrales. En los primeros 90 minutos se valora la captación. Si la medición se demora dos horas se valora también metabolismo de la dopamina. Se usan también fracciones de plasma para estimar la constante de captación y se pueden separar las constantes de transporte y de decarboxilación.

Estudios previos de PET con 18F-DOPA en pacientes con hemiparkinsonismo demostraron una disminución de acúmulo de radiactividad en el estriado contralateral (Garnnet y cols., 1984). Tras este trabajo inicial, el PET con 18F-DOPA se ha ido perfilando como una técnica de estudio in vivo de la función dopaminérgica. En la EP la captación se encuentra disminuida en ambos putámenes, aunque predominando en el contralateral al lado más afecto, y es bastante simétrica en ambos caudados. La disminución en la captación de L-DOPA se correlaciona con la hiperfunción tálamo-basal evidenciada en el PET con fluoro-deoxi-glucosa (Eidelberg y cols., 1990). En pacientes con clínica bilateral se evidenció una disminución de la actividad dopaminérgica en putamen, siendo los parámetros en caudado normales. Otros estudios encontraron también baja captación en caudado respecto a controles. En la EP se cifra que la reducción de la captación es de un 50% en putamen, con al menos un 35% de esa pérdida desde el inicio de los síntomas (Brooks y cols., 1991). Recientemente se ha observado que la pérdida en captación se localiza inicialmente en el putamen dorsal, avanzando hacia zona ventral según progresa la enfermedad, llegándose a afectar finalmente los caudados (Morrish y cols., 1996). Una pérdida de un 50 % en captación putaminal se corresponde con un 60-80% de pérdida de neuronas en la SNpc (Snow y cols., 1993). La pérdida de captación estriatal se correlaciona con las alteraciones motoras (Leenders y Palmer, 1996). También se ha cuantificado la pérdida a lo largo de la evolución de la enfermedad cifrándose en una caída del 9% anual en putamen y en un 3% anual en caudado (Morrish y cols., 1996), aunque no se evidenció una correlación positiva con el declinar en ítems motores de la UPDRS. Basándose en estos parámetros, el realizar PET con 18F DOPA seriados constituye una medida ideal para valorar la posible eficacia de estrategias neuroprotectoras.

Permite también el diagnóstico diferencial entre síndromes rígido acinéticos. En el complejo ELA-Parkinson-demencia de Guam, en gemelos asintomáticos de enfermos con EP, tanto mono como dizigóticos (Piccini y cols., 1999), en personas asintomáticas en familias con EP (Piccini y cols., 1997) y también en el parkinsonismo por fármacos, se han descrito disminución de la captación de fluorodopa (Brooks y cols., 1991). Por

ejemplo, en el caso de la PSP, se evidencia una disminución de la captación en caudado y putamen de similar intensidad, a diferencia de la enfermedad de Parkinson en la que la disminución está casi totalmente limitada al putamen (Brooks y cols., 1990).

En 6 sujetos con exposición al MPTP, que no habían desarrollado parkinsonismo, los valores medios en estriado se encontraron disminuidos. Analizando sólo el caudado los niveles son significativamente menores que en los controles e indistinguibles de pacientes con EP. Por el contrario los valores son significativamente mayores que en la EP. Dichas personas padecían una alteración cognitiva similar a los pacientes con EP o con parkinsonismo por MPTP (Calne y cols., 1985). No encuentran correlación entre dosis total de MPTP y disminución de los valores de captación, luego existe una distinta susceptibilidad individual. Al realizar dos estudios PET en 10 personas expuestas al MPTP, 5 inicialmente asintomáticas, con un intervalo de 7 años, el PET index [(estriatal-occipital)/ratio occipital] disminuyó un 2.3% por año, una progresión similar a la observada en la EP (Vingerhoets y cols., 1994). El evidenciar una progresión en la captación en el 18 F-DOPA PET en sujetos expuestos al MPTP apoya la hipótesis de que la exposición puntual a un agente ambiental puede ser la causa de enfermedades progresivas de aparición demorada en el tiempo (Calne y cols., 1997).

Hay también estudios realizados en primates no humanos expuestos al MPTP. En monos rhesus (*Macaca mulatta*) que habían recibido 0,5-2,5 mg/kg de MPTP 2-3 semanas antes al realizar PET con 6-18F-DOPA se observó que la actividad 18F en sangre disminuye triexponencialmente y la actividad estriatal va aumentando con un máximo a los 15 minutos y después disminuye con una semivida de 5 horas. En las zonas no dopaminérgicas desaparece la actividad mucho antes con una vida media de 70 minutos (Chiueh y cols., 1986). Realizando el PET-scan a las 2 horas de la administración de MPTP se ve que no hay variación en la captación estriatal; a los 3 días hay un aumento (160%) y a los 10 días una disminución (45% del basal). El MPTP produce inicialmente un aumento y más tarde una disminución progresiva de la DA estriatal (Burns y cols., 1983; Chiueh y cols., 1984). La captación está disminuida también en monos asintomáticos tras la exposición al MPTP (Guttman y cols., 1988). Estudios de PET con 18 F-DOPA a distintos tiempos tras la lesión por MPTP en monos rhesus, demuestran un perfil temporal en la degeneración de terminales y de neuronas nigricas compatible con degeneración retrógrada. Además se evidencia una regulación al alta transitoria en la sustancia nigra del lado lesionado (Eberling y cols., 1997). Hay

controversias sobre la reversibilidad del cuadro hemiparkinsoniano en los primates, en gran parte debido a la complejidad de la evaluación clínica, por lo que estudios con PET pueden ser de gran ayuda. Seguidos al menos un año se observó recuperación sólo en alguno de los parámetros conductuales evaluados. En 4 monos, el cociente entre la constante de influjo de dopa (K_i) en estriado lesionado y el no lesionado, varía menos de un 5% en estudios PET con 18 F-DOPA seriados realizados a los 1-2, 5-7 y 9-11 meses post-MPTP unilateral, lo que indica que la lesión es estable a lo largo de ese tiempo. Sin embargo, a los 9-11 meses un animal mejoró desde el punto de vista motor sin que variase su F-DOPA k_i ratio. Esto indica que la combinación de datos clínico-conductuales y bioquímicos son necesarios para establecer la estabilidad, o no, de la lesión y, consecuentemente, la eficacia de estrategias terapéuticas (Schneider y cols., 1995; Melega y cols., 1996). La captación estriatal de F-DOPA en monos cynomolgus normales, y tras administración de MPTP intracarotídeo, mostró correlación positiva con el tamaño y número de neuronas dopaminérgicas, los niveles de DA y catecolaminas totales estriatales y los niveles de enzimas de su síntesis. Se evidenció también pérdida de actividad TH en el lado contralateral y en las neuronas supervivientes del lado lesionado (Pate y cols., 1993). La validez del PET como indicador del estado del sistema nigroestriatal fue comprobada también por nuestro grupo al evidenciarse correlación con el número de neuronas TH en monos hemiparkinsonizados tratados con EGF y FGF (De Yébenes y cols., 1998).

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Hipótesis experimental: El número de neuronas dopaminérgicas, su actividad, funcionalidad y capacidad de recuperación tras lesión, es manipulable mediante administración de productos endógenos, como la secreción glial, o factores neurotróficos.

Hipótesis operativas:

- 1- El medio condicionado por glía previene y revierte los daños producidos por la administración de 6-OHDA en ratas.
- 2- FGF y GDNF administrados en estriado mejoran el cuadro clínico, neuroquímico y radiológico de hemiparkinsonismo inducido por MPTP intracarotídeo en primates.

OBJETIVOS

Determinar la eficacia y seguridad de terapias neurotróficas (FGF, GDNF, MCG) vía intraestriatal en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson.

- En roedores:

I. Evaluar el efecto del MCG en la recuperación de la lesión establecida por 6-OHDA, cuantificado a través de la variación en parámetros generales (supervivencia, peso) de los animales, la recuperación en los niveles cerebrales de monoaminas y la disminución en la supersensibilidad por denervación expresada por la rotación contralateral inducida por apomorfina.

II. Valorar el efecto protector del MCG de la toxicidad mediada por 6-OHDA cuantificado igualmente mediante variación en parámetros generales, niveles de monoaminas cerebrales y tasa de rotación inducida por apomorfina.

- En primates:

III. Precisar las características del modelo de lesión nigroestriatal producida por inyección intracarotídea de MPTP en Macaca Fasciculata, incluyendo la definición temporal del cuadro clínico, los cambios en la neurotransmisión dopaminérgica cuantificada a través de los metabolitos en LCR, el estudio metabólico in vivo mediante PET con 18 F-DOPA y los cambios anatomopatológicos.

IV. Evaluar los efectos de la infusión crónica de FGF y GDNF sobre los signos motores en primates hemiparkinsonizados, la tasa de rotación inducida por apomorfina, los niveles de monoaminas en LCR, la actividad dopaminérgica cuantificada mediante PET con 18 F-DOPA y los cambios anatomopatológicos.

V. Relacionar la variación en parámetros clínicos con la modificación en los índices del PET con 18 F-DOPA, el número de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y la densidad de sus terminales en estriado.

VI. Estudiar la morbilidad atribuible a la infusión a largo plazo de FN en primates parkinsonizados, tanto en lo que se refiere al compuesto químico como al método de administración, incluyendo los problemas que puedan aparecer tardíamente por proliferación de estirpes celulares no deseables (gliosis, oncogénesis, hidrocefalia).

III. MÉTODOS

A. Experimento 1. Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OHDA en ratas.

A.1. Cirugía estereotáxica, manejo de animales, lesión con 6-OHDA.

Hemos usado ratas Wistar macho de 185-200 g de peso, criadas en el animalario de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Los animales se mantuvieron en jaulas de 6, salvo después de la implantación del catéter, cuando se colocaron en jaulas individuales. Las condiciones ambientales fueron las habituales (temperatura constante, 12 horas de luz) con libre acceso a pienso comercial para roedores (Letika, Barcelona) y agua.

El día de la cirugía, los animales fueron pretratados con desipramina, 25 mg/kg intraperitoneal, con objeto de preservar las neuronas noradrenérgicas y con pargilina, 25 mg/kg intraperitoneal (Sigma Chemical Co., Alcobendas) que evita el metabolismo de la neurotoxina, 75 y 30 minutos, respectivamente, antes de la anestesia con hidrato de cloral disuelto en agua destilada momentos antes de su uso, 375 mg/kg intraperitoneal (FEROSA, Alcobendas). Para la inyección de 6-OHDA, los animales se colocan, una vez rasurada la cabeza, en un marco estereotáxico (Kopf Stereotaxic Instruments, Tujunga, CA, USA) con la barra de los incisivos situada a -2,3 mm respecto a la línea interauricular. Tras abrir la piel se realiza un trépano en las coordenadas AP: -4,4, Lat: +1 respecto al bregma, según atlas de Pellegrino y cols. (1979) y se profundiza 7,8 mm de profundidad respecto a la duramadre con el fin de alcanzar el fascículo longitudinal medial.

La 6-OHDA (Sigma Chemical Co., Alcobendas), 8µg base libre / 4 µl, se prepara en suero salino 0.9% con ácido ascórbico al 0.02% y se mantiene fría hasta que se inyecta con una jeringa Hamilton a una velocidad de 1µl/min durante 4 minutos, manteniendo la aguja un minuto más antes de retirar para evitar reflujo de la solución. Tras retirarla se cierra la piel con puntos sueltos y se coloca a los animales en una jaula bajo una fuente de calor, hasta que despiertan de la anestesia.

A.2. Medida de la rotación.

A las 4 semanas de la cirugía las ratas se colocan individualmente, en rotómetros automáticos esféricos de metacrilato, asegurándolas mediante un arnés torácico de velcro ([Figura 2](#)). Se observa su comportamiento durante un período de habituación de 10 minutos y entonces son inyectados con apomorfina 0,25 mg/kg subcutánea, disuelta en una solución de metabisulfito de sodio al 0,5%. Las rotaciones se definen como vueltas completas de 360° y se recogerán el número de rotaciones, como la diferencia neta entre las dos direcciones de giro, entre el minuto 10 y el 30 post-inyección. Fueron considerados bien lesionados, y seleccionados para evaluar el efecto restaurador del MCG sobre la lesión establecida por 6-OHDA, los animales con una respuesta rotacional neta contralateral mayor o igual a 60 (3 o más vueltas por minuto). Este test fue solamente realizado dos veces con el fin de evitar sensibilización.

A.3. Implantación del catéter e infusión

Los animales seleccionados son anestesiados con hidrato de cloral (375 mg/kg intraperitoneal) y colocados de nuevo en el aparato estereotáxico, en esta ocasión, con la barra de incisivos situada a -5 mm, siendo las coordenadas empleadas AP: +2 y Lat: +3 con respecto a bregma. Se realiza una incisión longitudinal en la piel, retirándose piel y periostio y se realiza un orificio de 1mm², implantándose una cánula metálica verticalmente en estriado a una profundidad de 7 mm bajo la dura. La cánula fue cementada y asegurada con dos tornillos milimétricos al cráneo. Se cierra la piel con puntos sueltos y se coloca a los animales en una jaula bajo una fuente de calor hasta que despiertan de la anestesia. El conducto de la cánula se mantuvo permeable gracias a una guía central de alambre con una tapa enroscable a la parte externa de la cánula, aislándose así también de posible contaminación ([Figura 3](#)).

Los animales se distribuyeron en los grupos de tratamiento de manera que se asegurara una tasa de rotación media similar en los tres grupos. Durante las dos semanas siguientes a la implantación cada animal recibió seis bolos intraestriatales de MCG (n=7), medio definido (MD, n=8) o salino 0.9% (n=8), cada uno de un volumen de 6 µl. Tras la última infusión se cuantificó la rotación inducida por apomorfina de igual manera a la

previamente descrita y los animales fueron sacrificados por decapitación 72 horas después.

Figura 2. Rotómetro de metacrilato en el que se cuantificó el número de rotaciones tras la administración de apomorfina

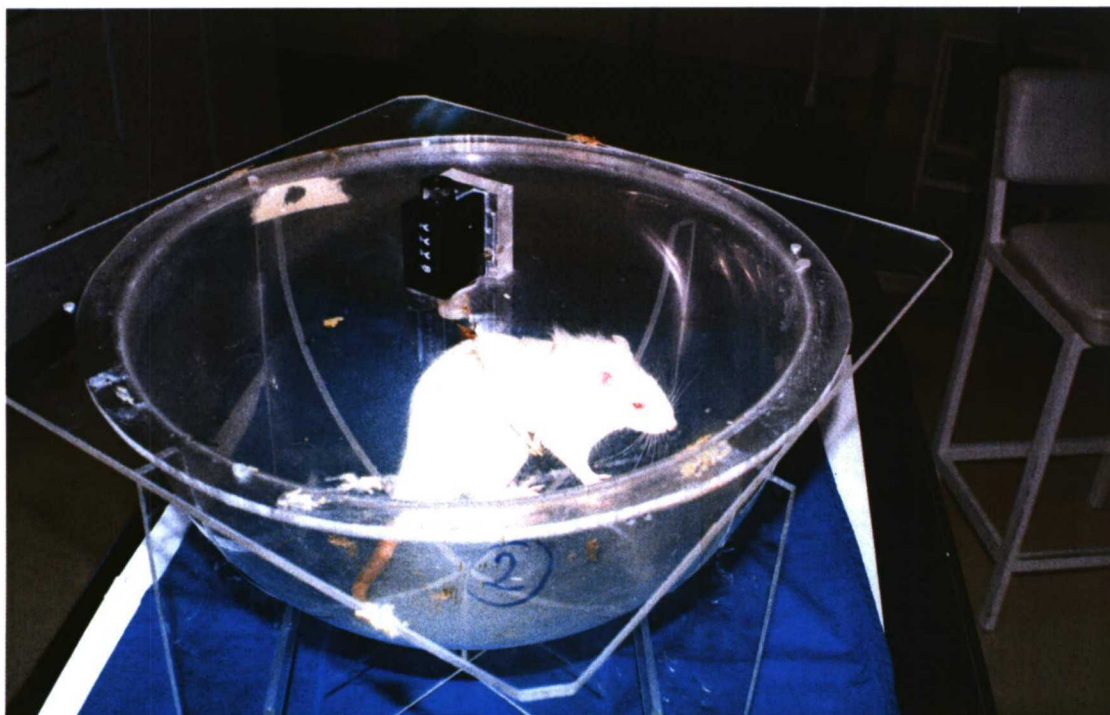
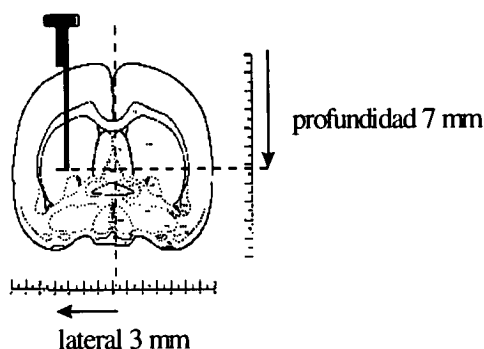


Figura 3. Representación esquemática de la localización de la cánula estriatal en las ratas. Corte coronal +2.0 AP con respecto a bregma (tomado de Pellegrino y cols., 1979)



A.4. Prevención de la toxicidad por 6 OHDA.

En este experimento la lesión con 6-OHDA se realizó de la manera descrita anteriormente pero en el mismo acto quirúrgico inmediatamente después de finalizar la infusión de 6-OHDA en el fascículo longitudinal medial, se realizó una inyección estriatal de 4 μ l de MCG (n=17), MD (n=17) o salino (n=16), en las mismas coordenadas definidas para la colocación de la cánula estriatal en el experimento previamente descrito (anteroposterior +2, lateral +3 y profundidad -7 respecto a bregma). Tres semanas después, las ratas se testaron con apomorfina de manera idéntica a la descrita y fueron sacrificadas por decapitación 72 horas después.

A.5. Preparación del MCG y medio definido (MD)

El MCG se obtiene de cultivos de glía mesencefálica según lo descrito previamente (Mena y cols., 1996). Se realizan cultivos de células mesencefálicas de rata en período embrionario (longitud 10-12 mm) (Mena y cols., 1993). Las células son sembradas en Dulbecco Modified Eagles's Medium (DMEM-FCS) suplementado con suero fetal 15% (FCS), piruvato sódico (1mM) y L-glutamina (4mM) a una densidad de 10^5 células/cm² en multipocillos de 16 mm de diámetro. Las células se mantienen en DMEM-FCS alimentándolas una vez por semana. Tras 2-3 semanas in vitro el 70-80% de

las células son astrocitos, demostrado por inmunotinción positiva para proteína gliofibrilar ácida (GFAP+).

Medio definido (MD) consiste en Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) y mezcla de nutrientes Ham F12, suplementado con D-glucosa (6 mg/ml), insulina (25 µg/ml), transferrina (100 µg/ml), putrescina (60 µM), progesterona (20 nM) y selenito de sodio (30nM), sin añadir antibióticos ni antimicóticos (Pardo y cols., 1997).

MCG es el medio obtenido tras mantener las células en MD durante 24 horas (Mena y cols., 1996). MCG y MD fueron obtenidos en el Laboratorio de Monoaminas el Hospital Ramón y Cajal (Dra. M^a Angeles Mena y colaboradores) y amablemente cedidos para los experimentos.

A.6. Estudio neuroquímico de monoaminas en regiones cerebrales

Los cerebros de los animales en los que se determinaron monoaminas (n=54) fueron inmediatamente extraídos, disecadas las distintas regiones cerebrales y rápidamente congelados a -80 °C. La disección se realiza siguiendo el procedimiento descrito por Carlsson y Lindqvist (1967), con ligeras variaciones: sobre la cara ventral de encéfalo se retira parte del sistema límbico, siendo visible la estría olfatoria, se le da la vuelta al cerebro y, levantando suavemente los hemisferios, se secciona el fórnix separando los dos hipocampos. Se secciona el cuerpo calloso y a continuación se separan ambos hemisferios siguiendo la arteria talamoestriada. Se separa el mesencéfalo por debajo de los tubérculos cuadrigéminos inferiores, manteniéndose en el mismo bloque diencefalo y mesencéfalo y, por último, se corta el cerebelo. Se separan, por tanto, 8 regiones: estriado derecho e izquierdo, sistema límbico derecho e izquierdo, diencefalo-mesencéfalo derecho e izquierdo, tronco derecho e izquierdo. Diencefalo y mesencéfalo se mantienen en un mismo bloque porque, debido a la inclinación de la sustancia nigra, es muy fácil, al realizarse la disección en fresco, seccionar la parte rostral del núcleo.

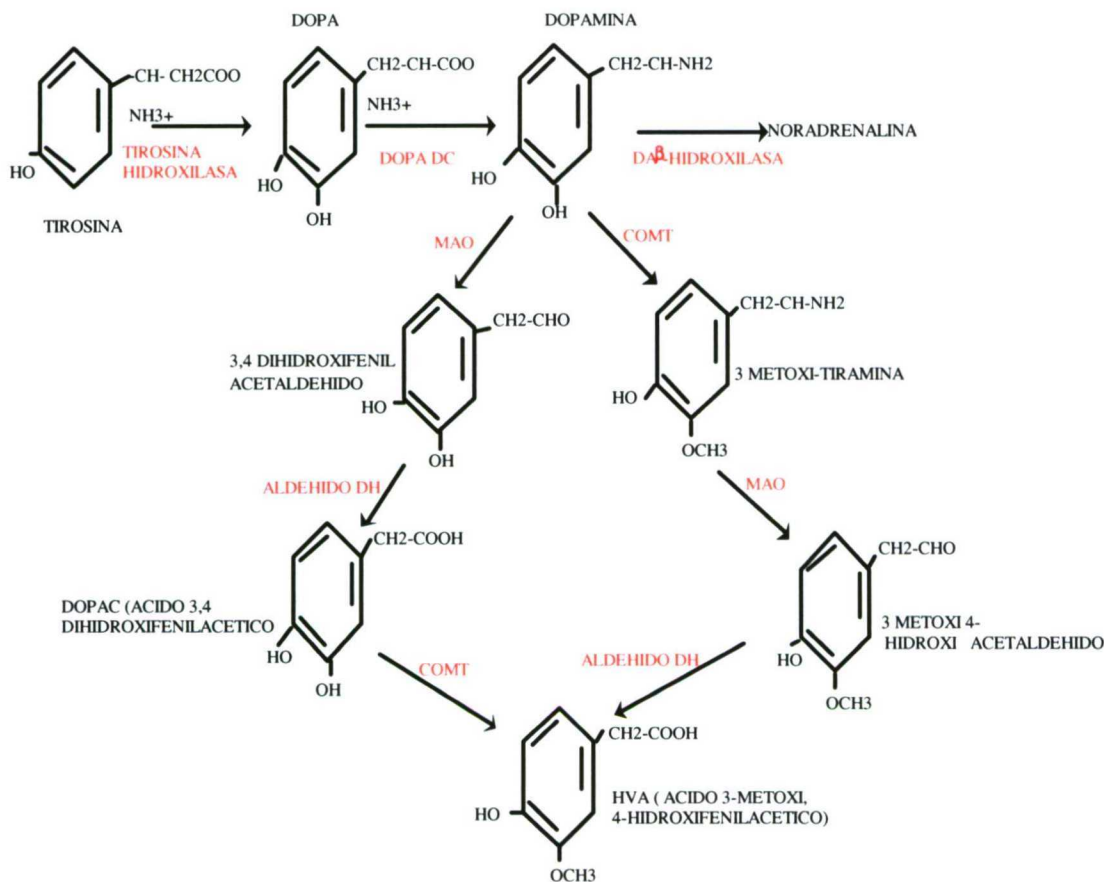
La separación de las distintas monoaminas y metabolitos se realiza mediante una cromatografía líquida de alta definición con columna de fase reversa y la cuantificación, mediante detector electroquímico según técnicas descritas (Mena y cols., 1986). Se determinaron niveles de dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y sus metabolitos. El ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) es el resultante de la oxidación de la dopamina por acción de la MAO y la 3 metoxitiramina (3-MT) de la metilación de

la dopamina vía COMT (catecol-O-metil-transferasa). El ácido homovanílico (HVA) es el producto final del metabolismo de las catecolaminas por efecto de ambas enzimas (Figura 4). Mediante el análisis de los niveles de los metabolitos podemos inferir la actividad enzimática y la aparición de mecanismos compensatorios. También se cuantificaron niveles de ácido 5-hidroxi-indolacético (5 HIAA), metabolito de la serotonina, y 3-metil,4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) metabolito de la noradrenalina.

Las regiones cerebrales son homogeneizadas en ácido perclórico (PCA), 0.4 N, en presencia de metabisulfito de sodio al 5% (20 µl/100 ml de PCA) y EDTA al 2% (400µl/100 ml de PCA). Se homogeneiza con ultrasonidos en hielo durante 3 minutos y se separa en microcentrífuga en cámara fría a 12.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasa por filtro millipore de 0.2 µm y se fracciona. Se utilizan dos alícuotas de 100 µl, una para catecolaminas y otra para metabolitos y se realiza inyección directa en el cromatógrafo.

El estudio neuroquímico fue realizado en el Laboratorio de Monoaminas del Hospital Ramón y Cajal (Dra. M^a Angeles Mena y colaboradores) y los datos amablemente cedidos.

Figura 4. Metabolismo de la dopamina.



A.7. Análisis de los resultados

Los estudios estadísticos se han realizado comparando medias de estas variables antes y después de la infusión en los distintos grupos mediante el uso de tests pareados. El análisis de niveles de monoaminas y metabolitos se realizó comparando niveles medios de las regiones analizadas entre los grupos de tratamiento. Los datos se expresan como media y error estándar de la media. Las diferencias significativas fueron evaluadas mediante el U test de Mann-Whitney para variables independientes para diferencias entre grupos y el test exacto de Fisher para mortalidad. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0,05$.

Los análisis fueron realizados gracias al programa SAS 6.12 (SAS Institute Inc., NC, USA) e INSTAT 2.02 (GraphPad Software, California, USA)

B. Experimento 2. Estudio de la tolerancia y eficacia de la infusión de FGF y GDNF en monos con hemiparkinsonismo inducido por MPTP

B.1. Generalidades

El estudio se realizó en 12 ejemplares macho de *Macaca Fasciculata* (*Macaca Irus*, *Cynomolgus monkeys*, Java monkeys) (iniciales A, C, F, G, J, K, B, P, N, Q, L, O) adquiridos en Holanda (Hartelust Co.). En el momento de iniciar el experimento tenían una edad media de 56.5 ± 1.4 meses (rango 45-64) y un peso medio de 3.439 gramos (rango 3.170-3.850). Dos animales más (un macho y una hembra de iniciales V y H) fueron empleados previamente para realizar un ensayo preliminar con el objeto de perfeccionar técnicas neuroquirúrgicas, implantación de catéter, dosis y volumen de infusión de los factores, así como realización de estudios farmacodinámicos de difusión cerebral de GDNF.

Los animales se han mantenido en jaulas individuales, en condiciones habituales (12 horas de luz, temperatura constante) con libre acceso al agua. En todo momento se han seguido las normas éticas para el manejo experimental de primates de la Fundación Jiménez Díaz y de las autoridades cantonales de inspección veterinaria de Zurich (Suiza) y Groningen (Holanda). Se alimentaron una vez al día ad libitum, con una dieta variada consistente en frutas, verduras, frutos secos y pan, administrada por los investigadores. En la habitación de primates se mantuvieron hasta 8 animales simultáneamente, pero siempre en jaulas individuales. Las dimensiones de las jaulas son de 80 x 75 x 100 cm. y las del pedestal, situado a 20 cm del suelo, 25 x 20 cm. Los examinadores que secuencialmente evaluaron a los animales lo hicieron en paralelo y de manera ciega, sin conocer a qué grupo de tratamiento pertenecían.

En todos los procedimientos en los que fue preciso, los animales se anestesiaron con clorhidrato de ketamina al 0,5% (0,6 mg/kg de peso) (Ketolar®, Parke-Davis, El Prat, Barcelona) y clorhidrato de tiazina 2% (0,6 mg/kg de peso) (Rompum®, Bayer) subcutáneos. En caso de requerir mayores períodos de anestesia se repitieron inyecciones

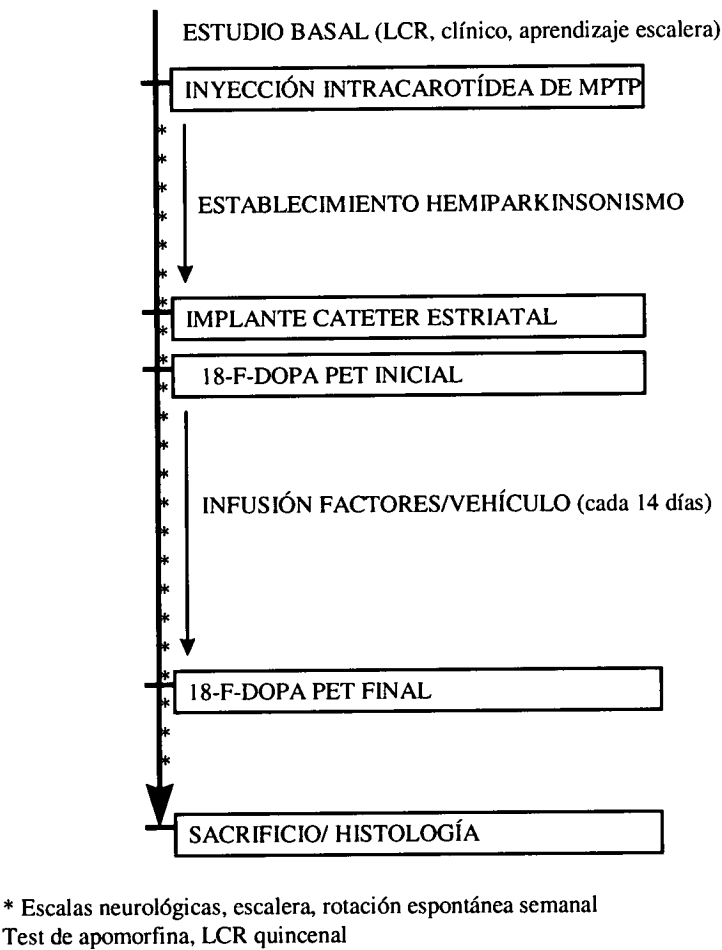
con dosis semejantes. Siempre que fue necesario anestesiarnos los animales fueron pesados.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron obtenidas siempre mediante punción lumbar a través del espacio interespinoso situado a nivel del borde superior de las crestas ilíacas, manteniendo al animal en decúbito lateral, y fueron inmediatamente congeladas. Aunque en general todas fueron realizadas por la mañana, se recogió el horario para evaluar posibles variaciones diurnas de los niveles de catecolaminas o metabolitos. Se desestimaron muestras en las que se sospechara contaminación sanguínea por trauma.

En la Figura 5 se esquematiza un calendario del experimento con los períodos de tiempo empleados en cada fase del mismo. Debido a que la instauración del hemiparkinsonismo no es homogénea en todos los animales y a que hubo que adaptarse a determinadas fechas disponibles para poder realizar los distintos procedimientos, los períodos no son temporalmente idénticos en los distintos animales. A lo largo de todo el experimento se registró diariamente el comportamiento motor y la posible aparición de eventos anormales como por ejemplo episodios de rotación contralateral espontánea, distonía, variaciones en el estado general. Se aplicaron semanalmente las escalas neurológicas para cuantificar la severidad del cuadro hemiparkinsoniano y se realizó el test de la escalera también con una periodicidad semanal. Durante los exámenes cada animal fue videofilmado mínimo durante 10 minutos. En los últimos 6 animales se recogió también el número de rotaciones espontáneas del animal dentro de su jaula (después de comer y sin someterle a ningún estímulo externo). Las muestras de LCR para análisis de metabolitos de monoaminas se obtuvieron cada 15 días y también cada 15 días, en semanas alternas, se registró el comportamiento ante la administración de apomorfina. Durante el período de infusión, el mismo día que se anestesiaba al animal para la administración de factor o vehículo, se realizó previamente la punción lumbar.

Se presentarán los datos clínicos de los 12 animales, 5 tratados con infusiones de FGF, 5 con GDNF y 2 con vehículo. En dos animales se ha prolongado el tiempo de infusión con el propósito de valorar la efectividad a largo plazo, ver si aparecen efectos secundarios tardíos y realizar un tercer F-DOPA PET antes del sacrificio.

Figura 5. Calendario del experimento de infusión de factores tróficos en primates hemiparkinsonianos.

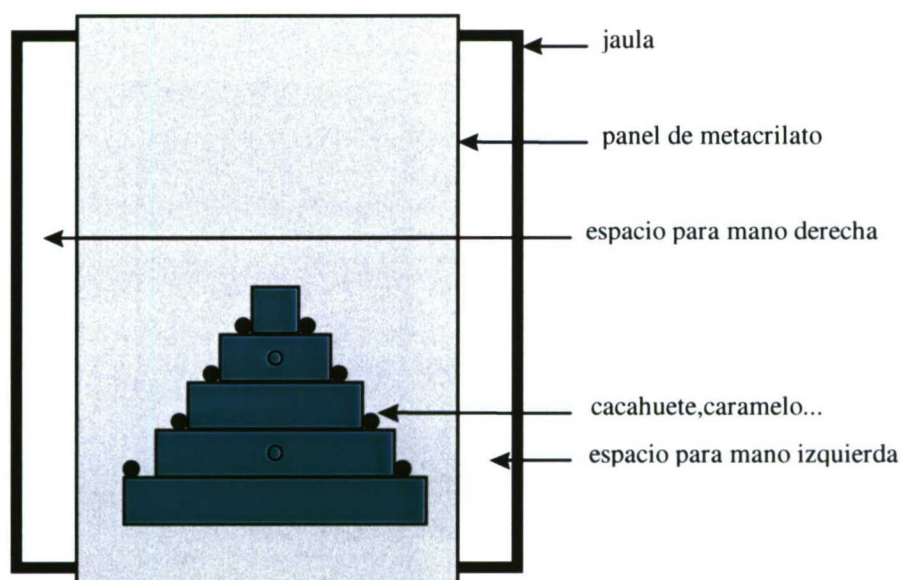


B.2. Evaluación clínica

Durante las semanas de adaptación de los animales al animalario se realizó estudio basal del comportamiento motor, registrando también la preferencia manual en caso de ser apreciada. Cada animal exhibe un comportamiento individual en lo que se refiere a grado de agilidad, interacción con los cuidadores y con los demás ejemplares, expresión verbal, postura, gustos alimentarios, por lo que es necesario registrar todos estos datos para poder después establecer cambios. Igualmente se obtuvieron muestras de líquido cefalorraquídeo para determinar los niveles basales de monoaminas y de sus metabolitos en cada animal. Además se procedió a adiestrar a los animales en la realización del test de la escalera, prueba diseñada para comparar el uso y destreza de ambos miembros superiores. Se coloca una escalera en forma de zigurat de 4 peldaños sobre una placa de metacrilato adosada a la jaula del animal de manera que pueda ver los premios gastronómicos (cacahuets, caramelos, bombones) que en ella se depositan (Figura 6). El panel con la escalera permite, teóricamente, que el animal únicamente pueda obtener la comida del lado derecho con su mano derecha y del lado izquierdo con la izquierda, pero con el aprendizaje algunos animales desarrollan estrategias para emplear la mano sana en ambos lados y coger varias piezas simultáneamente. Al requerirse un movimiento cuidadoso y preciso, permite evidenciar déficits neurológicos sutiles, que no serían apreciados en los movimientos habituales del animal en su jaula. Se colocó una pieza en cada escalón y se anotó el número de piezas alcanzadas con cada mano. Aunque inicialmente se cuantificó el tiempo requerido en completar cada uno de los lados, esa medida fue rechazada después, puesto que variaba en función del apetito o del capricho particular de ese momento y no era útil.

En varias ocasiones se procedió a colocar la escalera tras la administración de apomorfina, una vez finalizado el período de rotación, pero aún en período de respuesta terapéutica, con el fin de poder cuantificar posibles mejoras. No fue así: los animales estaban inquietos e inatentos y no colaboraban en la realización del test, por lo que se concluyó este estudio.

Figura 6. Representación esquemática de la realización del test de la escalera.



Tras la observación diaria del comportamiento, tanto espontáneo como ofreciendo alimentos, semanalmente se completó una escala neurológica ([Tabla 12](#)) modificada de la diseñada por Ovadia y cols. (1995). Se comprobó que, en esta escala, la valoración de la motilidad global era demasiado grosera para el estado de nuestros animales y no era sensible a posibles variaciones por lo que en los últimos seis animales se modificó este ítem, aplicándose uno modificado y definido como “nueva escala de acinesia funcional y motilidad global”. Con objeto de mejorar la variación interobservador, se precisó la definición de los términos, valorando la bradicinesia como la velocidad y fluidez durante la ejecución de actos motores voluntarios y el ítem “rigidez” en los movimientos involuntarios por lo que también es un indicador del grado de acinesia. Como puede comprobarse, en esta escala las puntuaciones más elevadas en motilidad global y en uso de la mano son las correspondientes a la normalidad, mientras que en los ítems bradicinesia, rigidez/acinesia, temblor, estabilidad, alteración postural y vocalizaciones, el cero corresponde a la normalidad. Para efectos estadísticos se calculó un ítem que reflejara el grado de severidad (SEV) del hemiparkinsonismo equivalente al sumatorio de las puntuaciones medias de rigidez (R), bradicinesia (B) y temblor (T) más la pérdida

media en motilidad global (MG) y uso (U). [SEV= R + B + T + (5- MG) + (3-U)] (rango teórico de 0 a 17).

Fueron también registrados el nivel de atención, el estado de los movimientos oculares y el grado de destreza bimanual, diseñándose pruebas específicas como por ejemplo la habilidad para mantener abierta una caja con una mano para obtener un premio con la otra.

A lo largo de todo el experimento se realizaron, de manera quincenal, inyecciones subcutáneas de apomorfina (0.05 mg/kg s.c.) diluida en suero salino (1 mg/ml) con el fin de valorar y videofilmar la respuesta rotatoria. Se recogió el momento de la primera y la última rotación contralateral al lado lesionado, el número medio de rotaciones en los minutos 5-6, 15-16 y 25-26 post-inyección, y la presencia de distonía y de estereotipias cuantificadas de 0 a 3 (0= ausencia; 1= leves ; 2= moderadas ; 3= severas, interfieren con rotación). En caso de ausencia de rotación se precisó si era debido a falta de respuesta a la apomorfina o bien a distonía severa o acinesia. Algunos animales, con el uso repetido de apomorfina, desarrollaron discinesias que fueron analizadas según sus características, localización, momento de aparición y finalización.

Tabla 12. Escala de evaluación neurológica en primates hemiparkinsonianos aplicada de manera semanal a cada animal (modificada de Ovadia y cols., 1995).

Motilidad global (0-5)

0= inmovilidad con riesgo vital

1= movimientos segmentarios

2= movimientos deambulatorios limitados en el plano horizontal

3= deambulación horizontal y subida al pedestal

4= movimientos en vertical pero sin conducta exploratoria ni interacción con cuidadores

5= comportamiento normal, exploratorio y agresivo.

Nueva escala de acinesia funcional y motilidad global (0-5)

0= pérdida total de movimientos corporales

1= movimientos segmentarios. No movimientos en plano vertical ni deambulación

2= deambulación cortas distancias. No movimientos en plano vertical.

3= deambulación. Algunos movimientos verticales, como sentarse en el pedestal. No balanceo ni saltos.

4= movimientos exploratorios en planos horizontal y vertical normal pero interacción pasiva con cuidadores u otros animales. Poca interacción o exploración fuera de la jaula.

5= comportamiento exploratorio y social normal.

Bradicinesia (0-3) Miembro superior/ miembro inferior

0= inicio normal del movimiento

1= discreta lentitud al inicio del movimiento

2= severa lentitud para iniciar el movimiento

3= severa dificultad para iniciar y mantener el movimiento; no la usa voluntariamente

Rigidez/Acinesia (0-3) Miembro superior/ miembro inferior

0= uso normal del miembro

1= menor uso que el contralateral

2= severa disminución de la capacidad de utilización del miembro superior para coger comida y del inferior para cualquier movimiento

3= incapaz (o se niega) a usar el miembro incluso para caminar

Temblor (0-3) cefálico/miembro superior/ miembro inferior

0= ausente

1= intermitente, ocurre durante el uso del miembro

2= presente casi todo el tiempo durante el uso, ocasionalmente en reposo, moderada amplitud o intensidad

3= continuo o intermitente pero de gran amplitud o intensidad, interfiriendo con la función del miembro

Uso de la mano lado lesionado (0-3)

0= ninguno o falla al apoyarse o agarrarse

0,5= uso únicamente para agarrarse a barrotes. No uso como muñón ni para coger alimento.

1= uso como muñón pero no coge alimento

2= coge la comida pero prefiere utilizar la sana inicialmente o se cambia los objetos a la sana rápidamente

3= normal

Estabilidad postural (0-2)

0= normal

1= discreta alteración pero mantiene bipedestación, ocasionalmente se agarra a los barrotes para ayudarse en la incorporación

2= caídas espontáneas

Alteración postural (0-2)

0= normal

1= discreta flexión de tronco

2= severa flexión de tronco

Vocalizaciones (0-2)

0= normales

1= reducidas

2= ausentes

B.3. Inyección intracarotídea de MPTP

Una vez adaptados al animalario y realizado el estudio basal, los animales fueron lesionados mediante la inyección de 0,4 mg/kg de MPTP intracarotídeo. Nosotros hemos empleado el modelo de hemiparkinsonismo desarrollado por Bankiewicz mediante inyección única de MPTP intracarotídeo. Estos monos desarrollan un hemiparkinsonismo contralateral bastante estable en el tiempo con rigidez, bradicinesia, heminegligencia y temblor (más postural que de reposo) en las extremidades contrarias al lado lesionado, sin repercutir severamente en estado general del animal. Los animales muestran un comportamiento rotacional unilateral hacia el lado lesionado que revierte con la administración de agonistas dopaminérgicos, que a dosis adecuadas provocan rotación contralateral.

El mismo día del procedimiento, el MPTP hidrocloreto (Sigma Chemical Co., Alcobendas) se diluye en suero salino estéril en condiciones de seguridad y con ropa protectora. Una vez anestesiado el animal se realiza cateterización supraselectiva de carótida interna izquierda a la que se accede por punción percutánea de femoral derecha y bajo control por arteriografía con substracción digitalizada. Una vez comprobado que la punta del catéter se encuentra en carótida intracraneal, se procedió a la inyección de MPTP en bolo seguido de 1ml de suero salino. En un animal (inicial Q) no fue posible el acceso a carótida izquierda por lo que fue administrado en carótida derecha y el animal desarrolló, por tanto, el hemiparkinsonismo en el lado izquierdo. El procedimiento se realizó en el Servicio de Neurorradiología de la Fundación Jiménez Díaz gracias a la amable colaboración de los doctores Pérez Higuera y Al-Rashid, así como de los técnicos y personal asignado.

Durante la siguiente semana se mantuvieron las condiciones de seguridad recomendadas: aislamiento de los animales, empleo de ropa protectora, mascarilla, guantes, incineración de materiales desechables, descontaminación de materiales no desechables con hipoclorito sódico.

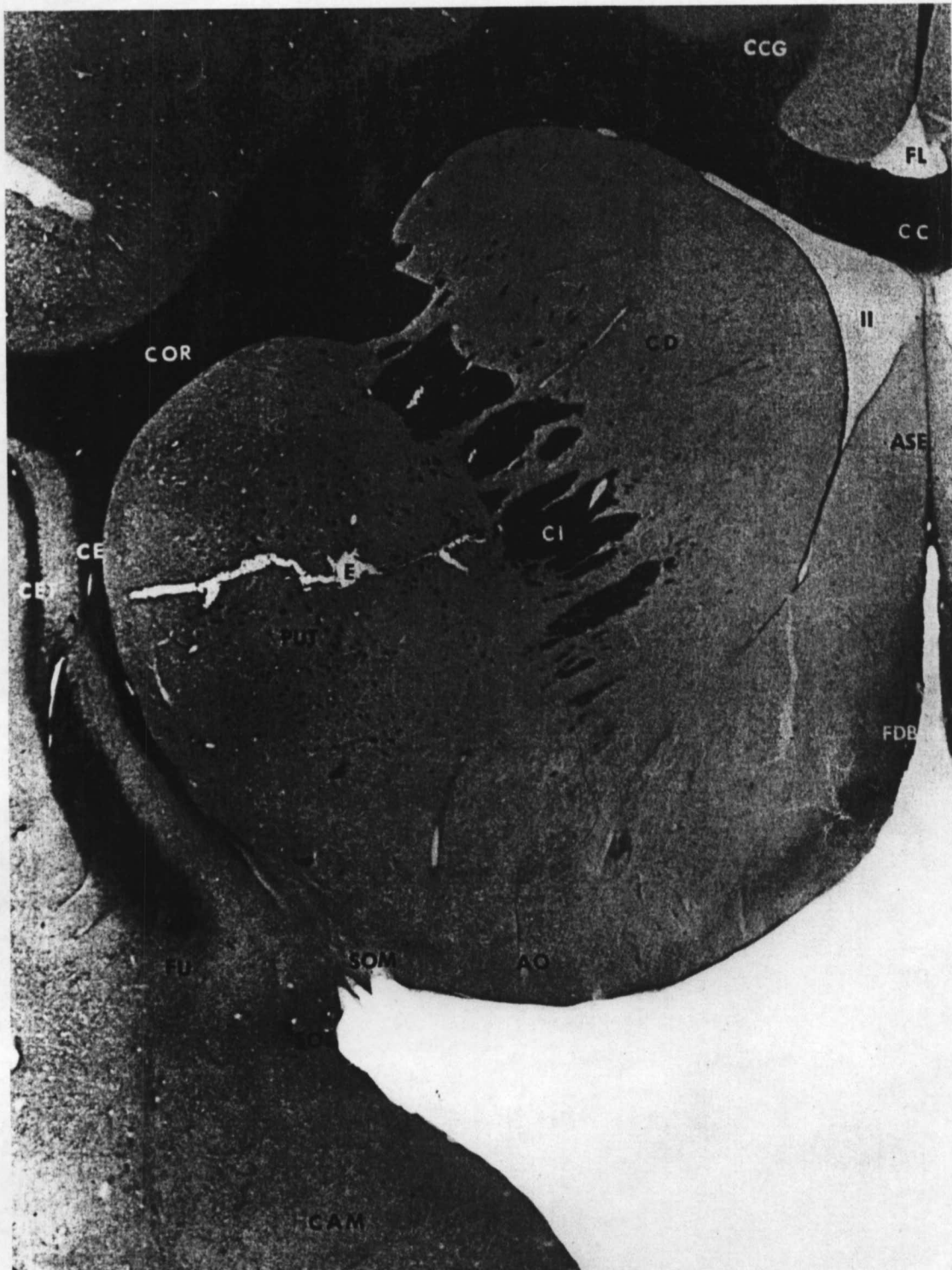
En 2 animales (iniciales L, P) fue necesaria la readministración del tóxico una segunda vez puesto que, transcurrido un período de tiempo de un mes, el cuadro de hemiparkinsonismo desapareció en su práctica totalidad.

B.4. Colocación del catéter e infusión de factores/vehículo

El lugar idóneo de implantación de la cánula para inyección del factor trófico se calculó de manera individualizada mediante realización de TAC craneal previo a la cirugía en cada animal. Para el cálculo de las coordenadas se empleó el mismo método usado para la realización del atlas estereotáxico en Macaca Irus tipo Horsley-Clarke de Shantha y cols., 1968. El plano horizontal se marca 20 mm sobre el plano Frankfurt, plano trazado uniendo el centro de ambos conductos auditivos externos y el borde inferior de la órbita. En un corte sagital, una línea perpendicular a ese plano que atravesase el centro del conducto auditivo externo, fija el cero en el plano anteroposterior. En los cortes coronales se calculó la coordenada lateral y la profundidad. Este método permite que el punto deseado sea alcanzado fácilmente, puesto que al animal se le realiza el estudio radiológico en la misma posición en la que va a ser después intervenido. El lugar elegido como óptimo para la colocación de la punta del catéter es el putamen anterior, en la zona próxima a la cabeza del caudado (Figura 7). En la Tabla 13 se exponen las coordenadas empleadas en los 12 animales.

Tras anestesia, los animales fueron colocados en el marco de cirugía estereotáxica y fijados mediante dos barras intra-aurales y otras dos a las arcadas infraoculares. Tras la apertura de piel se localizó el punto previamente calculado respecto al cero estereotáxico, se realizó un trépano y se colocó un catéter. En los primeros 6 animales se conectó a un reservorio que fue implantado bajo la piel del cráneo. En los últimos 6 animales intervenidos se emplearon unos catéteres diseñados específicamente para primates que permitían su implante perfectamente vertical con la barra del aparato de cirugía estereotáxica (Figura 8). En todos los animales el catéter se implantó en estriado ipsilateral a la arteria carótida interna donde se había inyectado previamente el MPTP.

Figura 7. Corte coronal (anterior 18.5) que se utilizó como referencia para el cálculo de coordenadas para el implante del catéter estriatal. (Tomado de Atlas de Shanta y cols., 1968).



AO: área olfactoria; CC: cuerpo calloso; CCG: cingulum; CD: núcleo caudado; CE: cápsula externa; COR: corona radiata; E: tracto del electrodo; FU: fasciculus uncinatus; PUT: putamen; SOM: stria olfactoria medialis; SOL: stria olfactoria lateralis.

Figura 8. Procedimiento de implantación del catéter estriatal mediante cirugía estereotáxica.

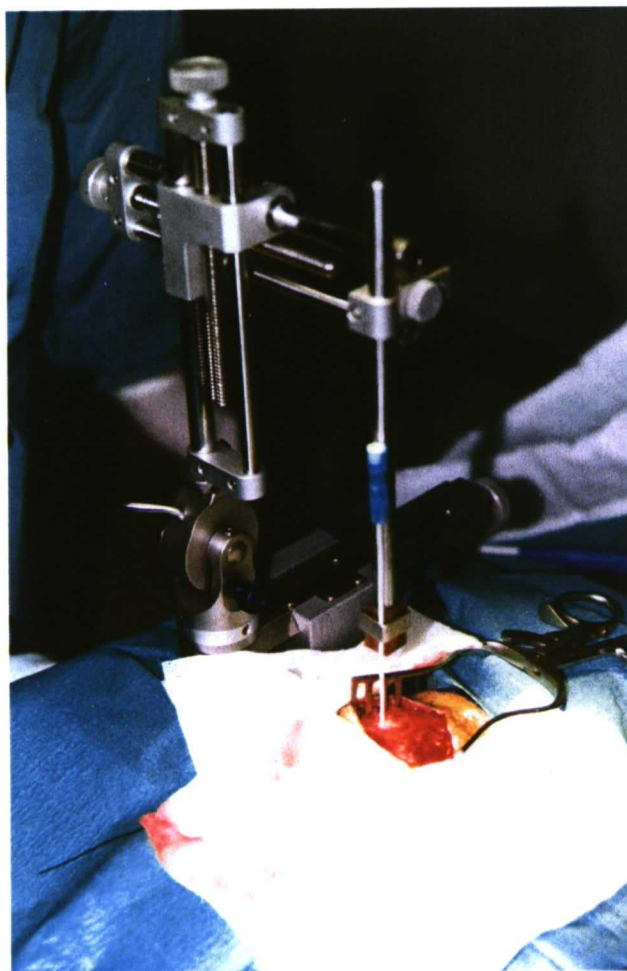


Tabla 13. Coordenadas en milímetros respecto al cero estereotáxico empleadas para la colocación del catéter estriatal en cada uno de los monos (AP: anteroposterior; Lat: lateral; Prof: profundidad).

Inicial	AP	LAT	PROF
A	19.1	11.5	17.5
C	19.2	8.3	17
F	17.4	11.5	17
G	20.5	10.4	17
J	17.1	10	17
K	18.9	11.5	17
B	18	11.5	17
P	20	11.5	19
Q	16	11.5	21
N	16	11.1	21.5
O	15.4	14.7	20
L	15.3	14.9	22.8

AP: distancia en dirección anterior desde la línea imaginaria que une ambos conductos auditivos internos; LAT: distancia lateral desde la línea media; PROF: distancia de profundización desde la duramadre.

Las dosis de factores tróficos empleadas fueron 5 µg de bFGF bovino recombinante (Boehringer Mannheim Biochemica) y 500 µg de GDNF (Amgen, California, USA) disueltos en PBS estéril en un volumen de 50 µl que fueron infundidos cada quince días. En los animales control se infundieron 50 µl de albúmina al 0,1% en PBS. El número total de infusiones realizadas en los doce animales fue de 129. Tras la inyección del factor o vehículo se procedió a la inyección lenta de un volumen de vehículo idéntico al volumen muerto del catéter (o del catéter junto con el reservorio en los seis primeros ejemplares) medidos previamente en cada animal.

Para evitar condicionantes en la valoración de los animales y para obtener datos con mayor rigor científico, la infusión se realizó de forma ciega, sin conocer a qué grupo de tratamiento pertenecía cada animal. La elección de la substancia a infundir en cada animal fue elegida por el director de la tesis intentando que cada grupo de tratamiento fuera homogéneo en cuanto a severidad del cuadro hemiparkinsoniano. Aunque los animales que posteriormente fueron infundidos con FGF tenían un cuadro más severo que los otros dos grupos de tratamiento, las diferencias no son estadísticamente significativas (severidad media en grupo FGF 7.10 ± 1.89 , en grupo GDNF 5.27 ± 2.58 , en grupo control 4.24 ± 1.17).

B.5. Estudio neuroquímico

Se determinaron en LCR niveles de HVA, MHPG y 5HIAA mediante HPLC/DE de manera similar a la previamente descrita en el experimento en roedores. Cuando fue posible se analizaron también triptófano, DOPAC y 3-MT.

B.6. Estudio radiológico funcional: PET con ^{18}F -DOPA

Se realizaron dos estudios de tomografía por emisión de positrones con 6- ^{18}F -fluoro-L-DOPA (PET F-DOPA): uno tras la colocación del catéter, previo al tratamiento, y otro después del período de infusión de factores (o vehículo). Para evitar los posibles efectos de la cirugía se intercaló un período de tiempo mínimo de 10 días tras el implante del catéter hasta la realización del primer PET F-DOPA (media 15 ± 1.82 días). El primer PET se realizó, como media, a los cinco meses de la lesión con MPTP (22.6 semanas + 1.22). El segundo se realizó aproximadamente un año después de la lesión con MPTP (55.4 ± 1.43 semanas) y después de un período de infusión de aproximadamente 6 meses (26.08 ± 1.4 semanas). Tras la realización del segundo PET F-DOPA se procedió al sacrificio en un período medio de 4.4 ± 0.9 semanas. En uno de los ejemplares (inicial L) se realizó un PET antes de iniciar el experimento para tener una referencia de los valores de captación de F-DOPA en un animal sano.

Los estudios se realizaron gracias a la colaboración con el Dr. Leenders y su equipo en el Instituto Paul Scherrer (Suiza) y en el Groningen University Hospital (Holanda) en un Siemens 933/04-16 PET-scanner, el cual recoge 7 planos simultáneamente (reconstrucción transaxial tras reconstrucción 8 mm FWHM). Fueron anestesiados con ketamina 10 mg/kg i.m. seguido por pentobarbital sódico 20 mg/30 min intravenosos hasta la finalización del estudio. Los animales eran tratados con carbidopa 5 mg/kg, i.v. (Merck, Sharp & Dohme Research Laboratory, Nutley, NJ), 60 minutos antes de la administración de F-DOPA. El análisis de los metabolitos plasmáticos se realizó en muestras recogidas a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos tras la inyección del trazador. Tras el scanner de transmisión, la F-DOPA fue infundida intravenosa en un volumen de 10 ml de suero fisiológico durante 3 minutos usando una bomba de perfusión continua. La recogida de información comienza con la inyección del trazador y el tiempo total es de 124 minutos. Las regiones de interés (ROIs) se localizan visualmente según normas

estándar en el plano en donde se encuentra la máxima captación estriatal. Una región elíptica de $79,2 \text{ mm}^2$ se colocó en cada uno de los estriados y una circular de 375 mm^2 en el mismo plano en la región posterior a los ganglios basales como área de referencia. La cantidad de F-DA acumulada en el estriado se estimó conforme a la “actividad estriatal específica”, definida como la diferencia entre actividades medidas en estriado y una región no dopaminérgica como el lóbulo occipital. Se calculó la tasa específica de captación estriatal (K_i) normalizando respecto a la concentración plasmática de F-DOPA.

B.7. Evaluación histológica

Para el sacrificio, tras ser anestesiados, se disecaron y cateterizaron ambas carótidas comunes a la altura del bulbo carotídeo, introduciéndose el catéter por carótida interna. Se realizó lavado con suero salino, canalizándose la vena cava para permitir la exanguinación. Se procedió entonces a la perfusión con paraformaldehído fresco al 4% en tampón bifosfato (PBS), neutralizado con sosa 10 N. La cantidad empleada varió entre 750 y 1.000 cc. Los cerebros fueron extraídos y se mantuvieron, en caso de no apreciarse una correcta fijación, en paraformaldehído durante un período de 24-72 horas para después colocarse en una solución de sacarosa al 25% hasta que se equilibran.

Tras los exámenes macroscópicos, se cortaron bloques de tejido (particularmente mesencéfalo y ambos estriados) que fueron inmediatamente congelados, realizándose cortes de 30μ de grosor que se fueron montados sobre portas previamente gelatinizados con poli-L-lisina, manteniéndose de igual manera congelados a -80°C hasta la realización de la inmunotinción. El resto del tejido se mantiene en formol hasta su tallado e inclusión en parafina.

Se realizó inmunohistoquímica frente a TH en sustancia nigra y estriado, y frente a glutámico decarboxilasa (GAD) y proteína glial fibrilar ácida (PGFA) en estriado. Preferimos realizar la inmunotinción sobre cortes montados para poderlo hacer de forma seriada. Tras 2 horas en una solución 50mM de PBS con Triton X-100 0.1 % (0,3%) las secciones se incuban en suero de cabra al 5% durante 1 hora y, tras varios lavados con PBS, se incuban con anticuerpos policlonales de conejo anti TH (Pel-Freeze Laboratories) a dilución 1:1000 en PBS durante 2 días a 4°C . Después de varios lavados con PBS, los cortes se incuban 2 horas con un complejo avidina biotinilada-peroxidasa (1:100) (Vector laboratoires) y a continuación, con 3,3'-diaminobencidina, amplificando

con una reacción de glucosa-oxidasa con cloruro de níquel. Los cortes son secados, deshidratados con alcoholes, aclarados en xilenos, cubiertos y sellados. Se realizan recuentos manuales en microscopio con una magnificación x 200. Se emplearon tres niveles de referencia: rostral, a nivel de los tubérculos cuadrigéminos superiores, intermedio, a nivel de la salida del tercer par y del núcleo rojo, y caudal, a nivel de núcleos interpedunculares. El recuento se realiza colocando una rejilla con dos líneas (“líneas prohibidas”) de forma que se incluyan todas las neuronas que están entre las dos, o las tocan, y ninguna neurona que cruce las líneas (Gundersen y cols., 1977). En algunos cortes se realizó, sobre la TH, una tinción de Nissl para valorar la posible supresión de la expresión TH sin muerte neuronal. Se valoró también la presencia o no de neuronas estriatales TH+ y la densidad de terminales TH+ en estriado realizándose una cuantificación de I a III (I: muy disminuida; II: disminuida; III: normal). El estudio se realizó en las distintas zonas estriatales: caudado, putamen y núcleo accumbens. Las personas que realizaron el análisis histológico no conocían a qué grupo de tratamiento pertenecía cada animal.

Los procedimientos anatomopatológicos fueron realizados en el Banco de Tejidos para Investigaciones Neurológicas de Madrid por la Dra. Gonzalo y el Dr. Rábano.

B.8. Análisis de resultados

De los aspectos motores recogidos (motilidad global, bradicinesia, rigidez, temblor, uso de la mano, estabilidad y alteración postural) se han realizado las medias de las puntuaciones en las escalas semanales a lo largo de las distintas fases del experimento para valorar la evolución de la clínica. Para valorar la eficacia de los tratamientos se descartaron las escalas de las 4 semanas iniciales (instauración de la clínica parkinsoniana) y las tres posteriores al implante del catéter. Para estudio de la variación en los índices de rotación y en los tests de la escalera también se compararon las medias obtenidas en la fase de clínica estable con las medias de la fase de tratamiento. Se compararon medias de estas variables, antes y después de la infusión, en los distintos grupos mediante el uso de test pareados, intervalos de confianza, t de Student y one way ANOVA. Para estudios de correlación se empleó en test de Spearman. Para evaluar eficacia entre los tres grupos de tratamiento se utilizó one way ANOVA. Los datos se expresan como media y error estándar de la media. Las diferencias fueron consideradas

significativas cuando $p \leq 0,05$. Los análisis fueron realizados gracias al programa SPSS 6.0 (SPSS Institute Inc., USA) e INSTAT 2.02 (GraphPad Software, California, USA).

IV. RESULTADOS

Experimento 1. Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OH-DA en ratas.

A.1. Efecto del MCG en la recuperación tras lesión establecida por 6-OH-DA

A.1.a. Efecto del MCG sobre peso y mortalidad

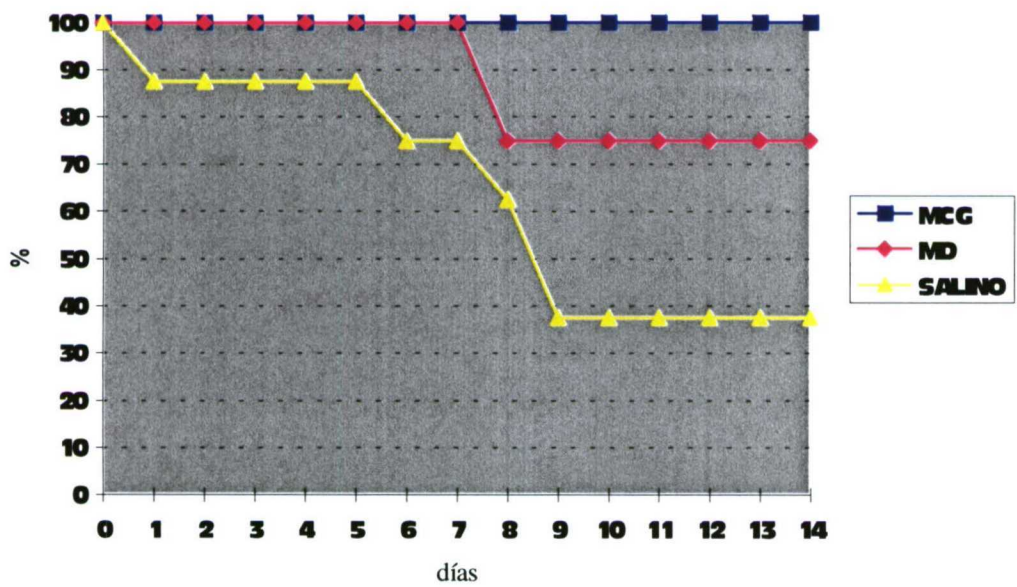
Previamente a la infusión estriatal el peso en los tres grupos experimentales era similar. Las ratas tratadas con MCG perdieron más peso ($30,7 \pm 16,5$ g) que las controles ($16,2 \pm 8,1$ g) pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Siete animales murieron durante el período de infusión (30,4%), 2 de ellos pertenecían al grupo tratado con MD (25%) y 5 al grupo infundido con vehículo (75%) (Figura 9). Todos los animales tratados con MCG terminaron el período experimental. La mortalidad global fue significativamente superior en las ratas tratadas con vehículo. Los animales que fallecieron durante el experimento tenían similares tasas de rotación inducida por apomorfina pre-infusión ($166,3 \pm 32$, n=7) que los que completaron el experimento ($148,1 \pm 17$, n=16).

A.1.b. Efecto del MCG en la recuperación de niveles cerebrales de monoaminas

Todos los animales que completaron el experimento (n=16) tenían una deplección marcada de DA estriatal en el lado lesionado. Comparando los niveles de los 5 compuestos analizados (DA, DOPAC, NA, 5-HT, 5-HIAA) en las 8 regiones cerebrales (estriado, cerebro límbico, diencéfalo y tronco, derechos e izquierdos) no se encontraron diferencias significativas entre las ratas tratadas con MD y con vehículo, por lo que para subsiguientes análisis fueron agrupadas en el denominado “grupo control” (n=9) para incrementar la potencia en los análisis estadísticos. Los niveles de catecolaminas, serotonina y sus metabolitos fueron semejantes en los estriados no denervados en ambos grupos, MCG y control (Tabla 14).

Los niveles de DA en el lado lesionado (izquierdo) fueron significativamente mayores en el grupo MCG en estriado ($242,1 \pm 69,2$ ng/g proteína) y en cerebro límbico ($455,8 \pm 108,4$ ng/g) que en el grupo control, $108,4 \pm 22$ y $110,8 \pm 36,4$ ng/g, ($p = 0,03$ y $p = 0,01$, respectivamente). Los niveles de DA en el estriado denervado se encontraban reducidos a un 3,9 % de los valores hallados en el lado sano ($242,1 \pm 69,2$ versus $6.168,8 \pm 357,5$ ng/g) en los animales infundidos con MCG y a un 1,8% ($108,4 \pm 22$ versus 5.780 ± 288 ng/g) en el grupo control. Igualmente, los niveles de DA en el cerebro límbico ipsilateral a la lesión con 6-OH-DA estaban disminuidos a un 45 % con respecto al lado contrario ($455,8 \pm 108,4$ versus 1.007 ± 189 ng/g) en animales tratados con MCG y a un 12 % ($110,8 \pm 36,4$ versus $881,7 \pm 219,3$ ng/g) en el grupo control (Figura 10). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de DA en tronco o diencefalo, ni en los niveles de NA, DOPAC, 5-HT y 5-HIAA en ninguna región cerebral.

Figura 9. Supervivencia a lo largo del experimento en los tres grupos de tratamiento.



MCG: medio condicionado por glía; MD: medio definido.

Tabla 14. Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OHDA: niveles de monoaminas y sus metabolitos en las distintas zonas cerebrales en animales con lesión unilateral (izquierda) por 6-OHDA e infusión repetida intraestriatal de MCG o DM/vehículo (controles).

	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA
MCG:				
Estr, izquierdo	242,15 ± 69,21*	50,67 ± 18,82	572,32 ± 96,99	374,48 ± 52,59
Estr, derecho	6.168,85 ± 357,50	709,68 ± 77,23	913,07 ± 84,69	349,40 ± 17,92
Controles:				
Estr, izquierdo	108,37 ± 22,00*	30,55 ± 7,09	477,03 ± 91,45	295,87 ± 31,47
Estr, derecho	5.780 ± 288,01	672,54 ± 52,02	913,03 ± 68,72	431,14 ± 64,20
MCG:				
limb, izquierdo	455,780 ± 108,36**	41,42 ± 11,19	919,83 ± 151,82	279,83 ± 34,44
limb, derecho	1.007,28 ± 188,9700	137,75 ± 20,20	658,57 ± 228,14	286,50 ± 76,91
Controles:				
limb, izquierdo	110,81 ± 36,37**	43,15 ± 22,78	628,42 ± 172,74	411,25 ± 136,67
limb, derecho	881,76 ± 219,260	143,42 ± 34,00	371,05 ± 123,37	144,57 ± 45,17
MCG:				
dien, izquierdo	224,78 ± 34,81	49,22 ± 16,81	770,22 ± 91,63	332,97 ± 62,51
dien, derecho	1031,67 ± 390,13	94,31 ± 17,99	775,17 ± 94,78	280,21 ± 45,31
Controles:				
dien, izquierdo	284,41 ± 59,56	46,28 ± 13,42	700,00 ± 72,31	398,70 ± 100,41
dien, derecho	549,33 ± 116,61	74,77 ± 13,88	674,36 ± 54,62	224,65 ± 26,32
MCG:				
tr, izquierdo	60,57 ± 6,38	15,57 ± 0,81	1046,14 ± 85,89	396,71 ± 14,45
tr, derecho	82,42 ± 8,22	21,14 ± 1,18	1022,85 ± 41,99	421,57 ± 19,94
Controles:				
tr, izquierdo	138,70 ± 50,43	26,92 ± 7,17	1048,20 ± 93,09	407,25 ± 23,50
tr, derecho	73,41 ± 5,22	23,12 ± 2,28	920,88 ± 53,14	410,88 ± 25,85

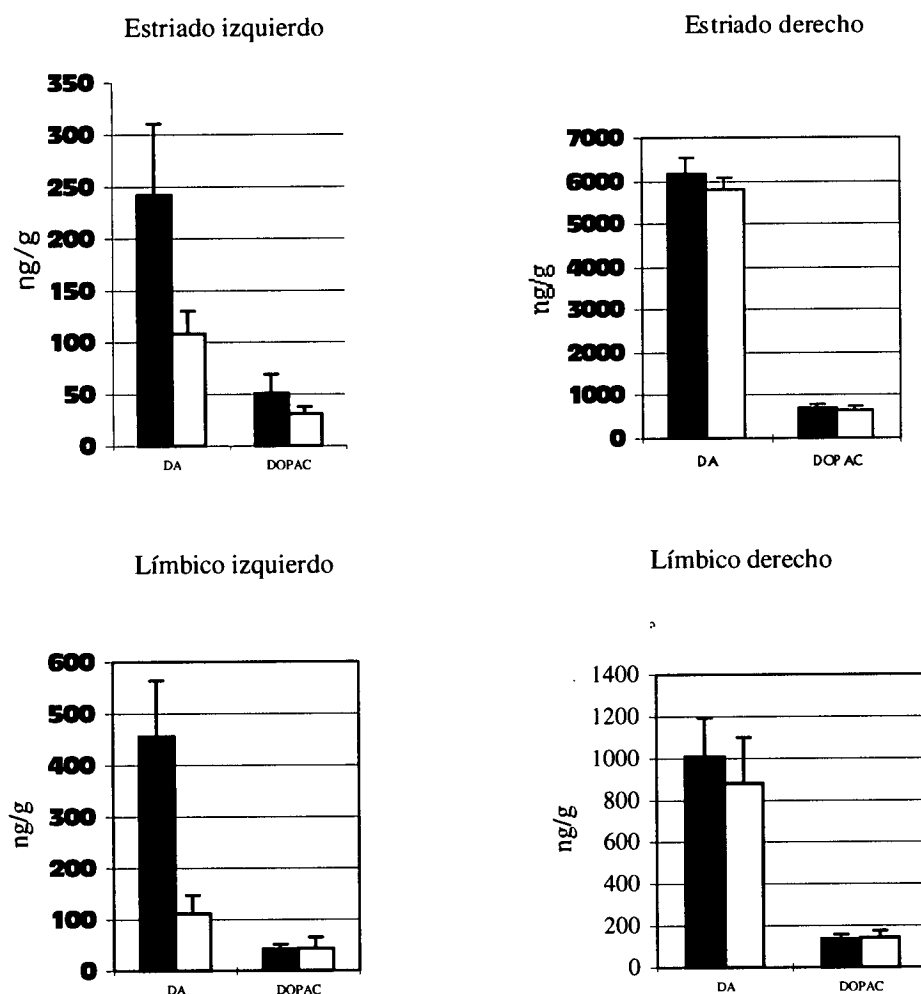
DA: dopamina; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT: serotonina;

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; NA: noradrenalina.

Estr: estriado; limb: cerebro límbico; dien: diencéfalo; tr: tronco.

Los valores representan la media ± SEM en ng/gr. tejido seco en al menos 6 animales para cada grupo. T-test a dos colas realizado en lados derecho e izquierdo, comparando animales tratados con MCG (n=7) vs controles en cada lado: * p=0,03; **p=0,01.

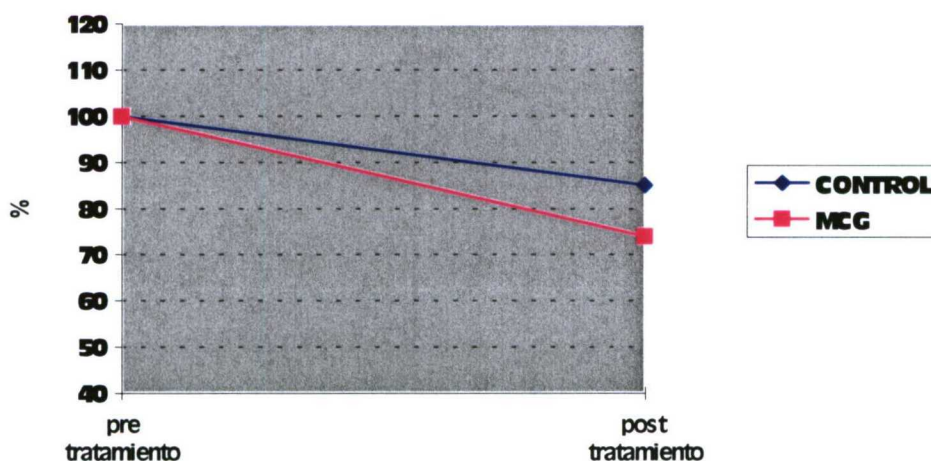
Figura 10. Niveles de DA y DOPAC en estriado y cerebro límbico en animales con lesión unilateral (izquierda) con 6-OH-DA e infusión intraestriatal repetida con MCG (azul) o MD/vehículo (controles; blanco). Los valores representan la media \pm error estándar en nanogramos por gramo de tejido seco en al menos 6 animales en cada grupo.



A.1.c. Efecto del MCG en la rotación inducida por apomorfina

La tasa de rotación inducida por apomorfina previa a la infusión estriatal de las distintas soluciones fue similar en los grupos experimentales (MCG = $165 \pm 30,2$; grupo control = $136,3 \pm 20,7$). Tras la infusión estriatal en el grupo tratado con MCG la rotación disminuye más que en el grupo control (grupo MCG = $-61,7 \pm 35$; grupo control = $39,2 \pm 18,8$) ($p = 0,05$) (Figura 11).

Figura 11. Efecto de la infusión intraestriatal repetida de MCG o MD/vehículo en la rotación inducida por apomorfina. Porcentaje medio de variación respecto a los niveles pretratamiento.



A.2. Efecto preventivo del MCG frente a la toxicidad por 6-OH-DA

A.2.a. Efecto del MCG sobre los niveles de monoaminas cerebrales

No se encontraron diferencias significativas al comparar niveles de DA, DOPAC y 3-MT entre las 8 regiones cerebrales analizadas (estriado, cerebro límbico, diencéfalo y tronco; lados derecho e izquierdo) entre el grupo tratado con MD o con vehículo. Por lo tanto, ambos grupos fueron también unificados en uno denominado “grupo control” (n=26).

Los niveles de DA y sus metabolitos, DOPAC y 3-MT, fueron similares en el lado no lesionado en el grupo infundido con MCG y en el control ([Tabla 15](#)).

Los niveles de DA en el estriado izquierdo (lesionado) fueron mayores en el grupo MCG (3.630 ± 499 ng/g proteína) que en el grupo control (2.456 ± 214 ng/g) ([Figura 12](#)).

De forma similar, el tratamiento con MCG aumenta los niveles de los principales metabolitos de la DA, DOPAC y 3-MT: los de DOPAC fueron significativamente mayores ($p = 0,01$) en estriado izquierdo en el grupo MCG ($260,7 \pm 29$ ng/g) que en el control ($165,7 \pm 19$ ng/g) y los de 3 MT también significativamente más elevados en

estriado izquierdo ($p = 0,02$) en el grupo MCG ($141,4 \pm 14$ ng/g) que en el control (99 ± 11 ng/g).

Tabla 15. Efecto preventivo del MCG frente a la toxicidad por 6-OH-DA: Niveles de monoaminas y sus metabolitos en las distintas zonas cerebrales en animales con lesión unilateral (izquierda) por 6-OH-DA e infusión simultánea única de MCG o DM/vehículo (controles).

		DA	DOPAC	3 MT	NA
MCG	Estr, izquierdo	$3.630,5 \pm 498,9^*$	$260,7 \pm 29,3^{**}$	$141,4 \pm 14,1^*$	$368,4 \pm 23,90$
	Estr, derecho	$6.746,6 \pm 400,00$	$349,0 \pm 14,700$	$176 \pm 18,5$	$479,2 \pm 18,2^*$
Controles	Estr, izquierdo	$2.456,8 \pm 214,7^*$	$165,7 \pm 19,2^{**}$	$99,0 \pm 11,4^*$	$335,9 \pm 21,90$
	Estr, derecho	$6.564,4 \pm 214,5$	$341,3 \pm 9,5000$	$164,5 \pm 6,800$	$435,8 \pm 11,6^*$
MCG	limb, izquierdo	$876,8 \pm 118,05$	$99,0 \pm 22,9$	$35,3 \pm 8,0$	$667,8 \pm 38,0$
	limb, derecho	$1.499 \pm 244,5$	$132,8 \pm 26,4$	$35,0 \pm 4,2$	$765,5 \pm 38,7$
Controles	limb, izquierdo	$696,9 \pm 84,7$	$75,7 \pm 8,9$	$33,0 \pm 5,7$	$612,9 \pm 32,4$
	limb, derecho	$1.547,0 \pm 123,9$	$145,9 \pm 2,2$	$36,9 \pm 3,5$	$737,3 \pm 32,9$
MCG	dien, izquierdo	$255,7 \pm 43,6$	$127,8 \pm 9,4$	$45,0 \pm 4,9^*$	$820,0 \pm 26,9$
	dien, derecho	$694,7 \pm 166,3$	$60,8 \pm 14$	$29,7 \pm 5,00$	$1514,3 \pm 115,7$
Controles	dien, izquierdo	$157,3 \pm 33,3$	$83,4 \pm 16,0$	$29,6 \pm 4,5^*$	$736,6 \pm 34,3$
	dien, derecho	$1.052,2 \pm 152$	$91,2 \pm 11,8$	$43,2 \pm 6,50$	$1.412,2 \pm 49,0$
MCG	tr, izquierdo	$83,3 \pm 5,40$	$19,3 \pm 2,0$	Na	$1.043 \pm 98,5$
	tr, derecho	$113,3 \pm 13,3$	$19,8 \pm 2,6$	Na	$924 \pm 14,0$
Controles	tr, izquierdo	$64,1 \pm 7,53$	$18,7 \pm 1,0$	Na	$1052,7 \pm 83,5$
	tr, derecho	$111,2 \pm 7,2$	$21,9 \pm 1,4$	Na	$986,9 \pm 49$

DA: dopamina; DOPAC: ácido 3,4-dihidrofénilacético; 3MT: 3 metoxitiramina; NA: noradrenalina.

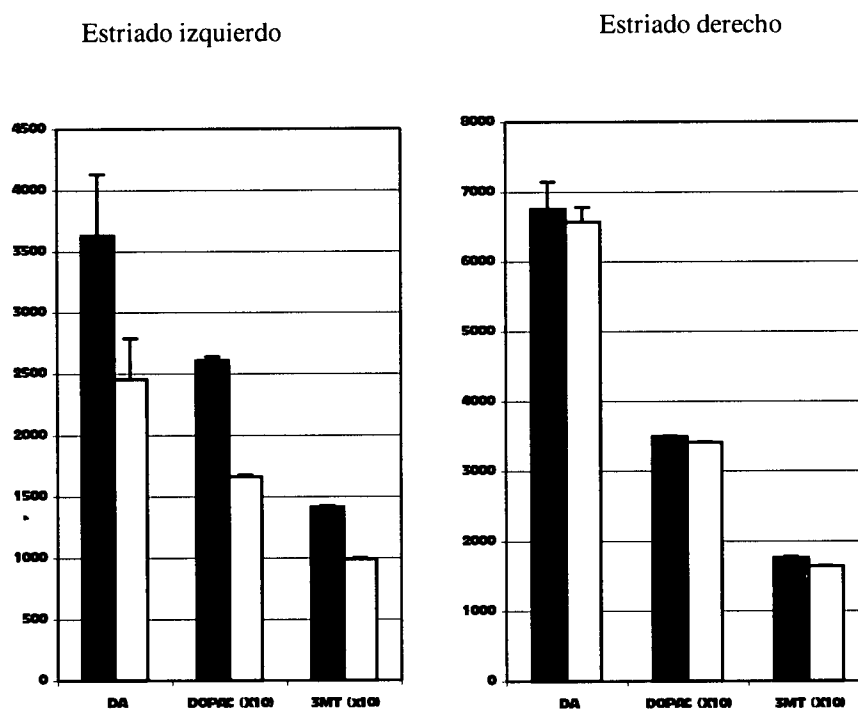
Estr: estriado; limb: cerebro límbico; dien: diencéfalo; tr: tronco; Na: no analizado.

Los valores representan la media \pm SEM en ng/gr. tejido seco en al menos 6 animales para cada grupo.

T-test a dos colas realizado en lados derecho e izquierdo, comparando animales tratados con MCG

($n=7$) vs controles en cada lado: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Figura 12. Efecto protector frente a la lesión por 6-OH-DA del MCG: niveles de DA, DOPAC y 3 MT en animales con lesión unilateral (izquierda) e inyección simultánea única de MCG (azul) o MD/vehículo (controles; blanco).



* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

A.2.b. Efecto del MCG sobre peso, mortalidad y rotación inducida por apomorfina

No hallamos diferencias significativas ni en mortalidad ni en peso entre los grupos. El tratamiento con MCG produjo una disminución en la intensidad de la rotación inducida por apomorfina (rotación media en el grupo tratado con MCG = $18,5 \pm 12$ vueltas/20 minutos; grupo control = $37,8 \pm 9$ vueltas/20 minutos), pero sin alcanzar la significación estadística ($p = 0,06$).

B. Experimento 2. Estudio de la tolerancia y eficacia de la infusión de FGF y GDNF en monos con hemiparkinsonismo inducido por MPTP

B.1. Descripción del modelo animal

B.1.a. Características clínicas

Inmediatamente después de la administración del MPTP intracarotídeo se observó midriasis ipsilateral y, en algunos animales, bostezos y movimientos de protusión de lengua transitorios. La anisocoria desapareció generalmente en 24-48 horas.

Durante los 14 procedimientos de cateterización supraselectiva de carótida interna para la administración de tóxico no hubo complicaciones ni tampoco en el proceso de cicatrización de la herida inguinal. No se encontró deterioro del estado general de los animales tras despertar de la anestesia, salvo en un ejemplar (inicial C). Este animal sufrió crisis parciales en hemicuerpo derecho con generalización secundaria durante una semana, siendo tratado con clonazepam. Por severa acinesia y anorexia requirió alimentación por sonda nasogástrica durante tres días. Tras finalizar el experimento se objetivó en el lóbulo temporal izquierdo, una cavidad quística rodeada de tejido reblandecido compatible con infarto en fase crónica, que se supone fue secundario al proceso de cateterización carotídea y responsable del cuadro descrito. Otro animal (inicial J) presentó dos crisis parciales derechas sin generalización secundaria el día siguiente a la lesión con MPTP.

En el día siguiente a la inyección de MPTP son frecuente los vómitos, la pérdida de apetito y cierto grado de postración en los animales. Cuatro animales (iniciales G, B, N y Q) mostraron un cuadro transitorio de distonía y movimientos anormales previo al desarrollo del hemiparkinsonismo. Los animales despertaron tras la anestesia aparentemente normales y fue tras un período de 2 a 7 días (media $4,5 \pm 1,3$) cuando apareció el cuadro de hemidistonía y movimientos anormales en el hemicuerpo contralateral. Alcanza su máxima intensidad en dos o tres días y desaparece entre los días 11 y 35 post-MPTP (media $20,25 \pm 5,34$). La severidad y las características del cuadro fueron distintas en los diferentes ejemplares, aunque en general se caracteriza por la postura distónica en extensión y rotación externa de extremidades. En el animal G

la distonía apareció en el día 2 post-MPTP, inicialmente en miembro superior y región cérvico-cefálica, una semana más tarde afectó con mayor intensidad el miembro inferior y desapareció en el día 11 post-MPTP. Durante ese tiempo el animal sufrió también episodios de rotación intensa en sentido horario, movimientos coreo balísticos ocasionales en las extremidades afectas así como posturas estereotipadas de predominio en miembro superior. El animal de inicial B sufrió el cuadro de hemidistonía entre los días 3 y 14 post MPTP. Asoció movimientos de características coreoatetósicas en miembro inferior y episodios de rotación en sentido horario de forma simultánea al desarrollo precoz del cuadro hemiparkinsoniano típico en miembro superior con postura en flexión. El ejemplar de inicial N fue el que desarrolló el cuadro con mayor intensidad y se produjo en los días 6 a 35 post-MPTP. Inicialmente se apreció tortícollis derecha. Más tarde el miembro superior derecho adoptó una postura en aducción extrema con extensión de codo y movimientos de flexo-extensión rítmicos en muñeca. Días más tarde asoció movimientos bálicos en miembro inferior y tardíamente, flexión extrema en cadera con rodilla extendida, llegando a golpearse involuntariamente la cara con el miembro inferior. En el animal de inicial Q el cuadro apareció más tardíamente (día 7 post-MPTP), permaneció casi constante durante 3 semanas y después, durante 14 semanas aparecía únicamente durante unos minutos cuando se sometía a un estrés al animal. Sufrió extensión extrema de miembro superior con movimientos atetósicos en mano y de flexoextensión de tobillo con rodilla flexionada.

Nunca aparecieron signos distónicos en el hemicuerpo ipsilateral a la lesión. En algunos animales permanecían aún posturas distónicas cuando comenzaba ya a apreciarse el cuadro típico hemiparkinsoniano, es decir, la bradicinesia, la rigidez y el temblor, por lo que el límite temporal exacto entre ambas entidades es difícil de precisar. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los animales que sufrieron distonía y los que no, en cuanto a edad (distónicos: $55 \pm 3,34$ meses; no distónicos: $57,25 \pm 1,55$ meses). El desarrollo del cuadro distónico inicial no es indicativo de la aparición posterior de un cuadro hemiparkinsoniano más severo.

La instauración del cuadro de hemiparkinsonismo tampoco fue homogéneo. En algunos ejemplares fueron apreciables los signos parkinsonianos desde el primer día post-MPTP, pero en otros el inicio se demoró hasta el cuarto. Dichos signos aumentaron de manera progresiva hasta estabilizarse el cuadro en una media de $5,1 \pm 0,52$ semanas (rango 3 a 8 semanas). El primer signo apreciable suele ser la acinesia en la extremidad

superior y el cambio en la dominancia manual pasando a utilizar de primera intención, la mano izquierda o, por lo menos, a utilizarla más frecuentemente que antes de la lesión. Posteriormente algunos ejemplares desarrollan postura en flexión en el miembro superior. El temblor es el signo más tardío y las características del mismo varían en los diferentes animales. En general predomina un temblor postural y de acción de media amplitud y una frecuencia rápida, aunque en otros ejemplares y, en fases más avanzadas, se aprecia un temblor de reposo más lento y otros nunca desarrollan temblor. Los animales presentan rotación espontánea ipsilateral a la lesión cerebral. El número medio de piezas alcanzadas en el test de la escalera en el período previo al tratamiento fue de $1,98 \pm 0,51$. En conjunto, la clínica fue más apreciable en el miembro superior y, una vez instaurado, el cuadro se mantuvo bastante estable en el tiempo previo a iniciarse el tratamiento en todos los animales. En un animal (inicial P) tras el período de infusión se apreciaron de forma tardía signos axiales e incluso leves en extremidades contralaterales.

En un animal (inicial L) no se apreció ningún cambio clínico en las cuatro semanas tras la administración del MPTP, por lo que se realizó un segundo cateterismo para infundir de nuevo otra dosis igual de MPTP. Pese a la doble lesión, desarrolló un cuadro muy leve evidenciable sólo en ocasiones por la presencia de temblor. El ejemplar de inicial P inicialmente sí desarrolló signos parkinsonianos, aunque leves, pero a partir de la semana 9 post-MPTP, mejoró significativamente. Se administró de nuevo MPTP, esta vez a mitad de dosis, es decir, 0,2 mg/kg de peso.

A partir de la tercera semana tras el MPTP se procedió a testar el comportamiento de los animales tras la estimulación dopaminérgica con apomorfina subcutánea. La respuesta rotatoria hacia el lado contrario a la lesión cerebral (derecha), se produjo ya desde esta primera administración y la intensidad de la misma se mantuvo estable en las sucesivas. Aproximadamente a los dos-tres minutos de la inyección se produjo la primera rotación. El final de la acción, fijada como el momento en que el animal rota en sentido ipsilateral a la lesión cerebral (izquierda), entre los 35 y 50 minutos. La primera rotación se precede de desviaciones fásicas de los ojos y cuello a la derecha. Bajo el efecto de la apomorfina mejora el uso de la mano, la velocidad y fluidez de los movimientos, el reconocimiento del hemicuerpo afecto, aparecen movimientos de masticación y bostezos. Existe gran variabilidad entre los animales tanto en el grado de rotación como en el desarrollo de distonía o estereotipias asociadas

a la administración de apomorfina. El número medio de rotaciones por minuto durante la fase de hemiparkinsonismo estable fue de $3,67 \pm 0,84$. Con las repetidas administraciones seis ejemplares (iniciales F, K, G, B, N y Q) mostraban movimientos anormales. La aparición de estos movimientos se produjo como media tras la dosis número de apomorfina $11,8 \pm 1,33$, con un rango entre el test número 10 y el 14. Los ejemplares que con mayor intensidad y frecuencia padecieron estos movimientos fueron los que habían sufrido previamente el cuadro de distonía en el período agudo post-MPTP (iniciales G, B, N y Q). El ejemplar Q curiosamente adoptaba, con la administración de apomorfina, posturas distónicas muy semejantes a las del período inicial. Salvo el ejemplar de inicial B, estos animales no padecían un hemiparkinson muy severo; incluso el ejemplar N sufría un cuadro muy leve y nunca desarrolló rotación tras la apomorfina pero sí movimientos anormales en lengua, faciales y posiblemente alucinaciones visuales (actuaba como si quisiera cazar moscas inexistentes). Los movimientos anormales son balísticos en unos ejemplares y de características más atetósicas en otros y predominan en miembro inferior, apareciendo con mayor frecuencia coincidiendo con la mayor efectividad de la apomorfina. Una vez instaurados, aparecían de nuevo con cada administración de apomorfina, manteniendo unas características semiológicas propias en cada animal, pero apareciendo en períodos más precoces y perdurando más tiempo. Un ejemplar (inicial K) con las últimas dosis de apomorfina desarrolló una distonía intensa generalizada, quedando el animal totalmente inmóvil en esa postura con abolición tanto de la rotación como de los movimientos anormales.

A lo largo del experimento, seis ejemplares (iniciales C, K, J, P, Q y O) presentaron episodios espontáneos de rotación a la derecha. Durante estos episodios el comportamiento era semejante al que ocurría tras la administración de apomorfina: se apreciaba inicialmente desviación fásica de ojos y cuello a la derecha, normalización de la postura del miembro superior y mejoría del uso de la mano, para posteriormente comenzar a rotar en sentido contrario al que normalmente lo hacían. La duración fue variable hasta un máximo de treinta minutos. En ocasiones coincidieron con momentos de agitación o miedo en los animales debido, por ejemplo, a ruidos o a la presencia de personas extrañas. En un ejemplar (inicial O), estos episodios se acompañaban a la presencia de posturas distónicas en miembro inferior. Ocurrieron en fases relativamente tardías del experimento, a partir, como media, de la semana treinta ($29,8 \pm 5,2$). Durante

las semanas en las que los animales exhibieron estos episodios no hubo mejoría en la exploración neurológica. No hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grado de severidad del cuadro hemiparkinsoniano entre los animales que presentaron episodios de rotación espontánea contralateral a la lesión cerebral (severidad media $5,99 \pm 0,87$) y los que no (severidad media $5,73 \pm 1,04$).

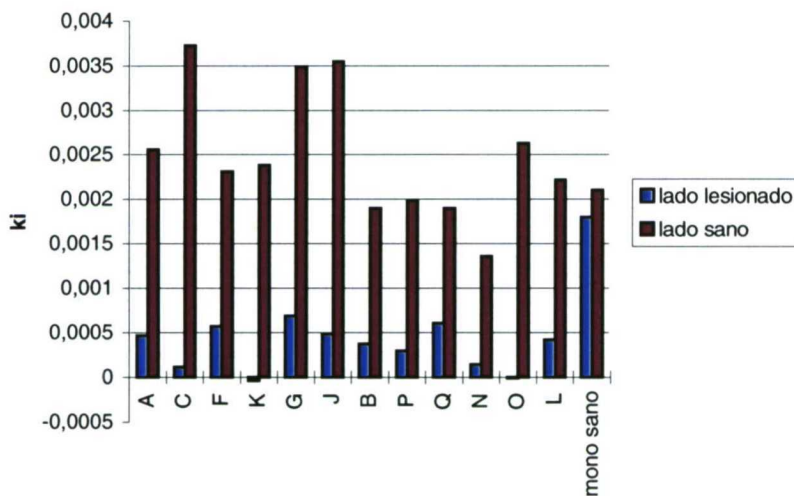
El procedimiento quirúrgico para la implantación del catéter estriatal se llevó a cabo una vez estabilizado el cuadro, entre las semanas 9 a 28 (media $19,66 \pm 1,5$ semanas). Tanto el sistema implantado como el procedimiento de localización de la diana se perfeccionó a lo largo del experimento. En los primeros 6 animales se realizó una segunda intervención para mejorar la colocación del catéter. En cuatro de estos animales la clínica fluctuó en las primeras semanas post-intervención, por lo que hubo que esperar para poder valorar la efectividad o no de la infusión. En los últimos 6 animales intervenidos, en los que se emplearon unos catéteres diseñados específicamente para primates que permitían su implante perfectamente vertical, se consiguió gran precisión con una única intervención y no hubo modificaciones en la exploración neurológica. Durante la cirugía no se produjeron complicaciones ni tampoco de manera inmediata. En dos animales (iniciales J y O) se produjeron tardíamente (semanas 35 y 19 post-MPTP respectivamente) problemas tróficos cutáneos en la piel que cubría el sistema implantado. En el animal J hubo que recolocar el reservorio cutáneo en dos ocasiones (semanas 38 y 42) y en el de inicial O, volver a implantar el catéter (semana 36). El ejemplar de inicial N presentó en la fase final del experimento, una vez completado el período de infusión, un cuadro brusco de disminución del nivel de conciencia y crisis parciales en hemicuerpo derecho con generalización secundaria. En la TAC craneal realizada se observó desplazamiento anterior de la punta del catéter y edema generalizado en hemisferio izquierdo y se procedió de manera inmediata al sacrificio del animal.

B.1.b. Características radiológico-funcionales

Los valores medios de captación obtenidos en el mono sano en ambos estriados fueron de $0,0021 \pm 0,0001$. La infusión intracarotídea de MPTP produce una severa disminución de la captación de F-DOPA estriatal ipsilateral: el descenso medio es de un 83% respecto a los valores normales (porcentaje medio de captación respecto a valores

normales $17,09 \pm 3,48$). La captación ($\times 10.000$) media inicial en el lado lesionado fue de $3,42 \pm 0,7$.

Figura 13. Captación estriatal de F-DOPA inicial en los 12 monos hemiparkinsonianos (antes del tratamiento) y como referencia los de un animal sano.



La severidad fue máxima en dos ejemplares (iniciales K y O) en los que se obtuvieron coeficientes negativos, es decir, menor captación que en una zona no dopaminérgica como es el lóbulo occipital. No encontramos correlación significativa entre el grado de captación estriatal en el lado lesionado (izquierdo) y la severidad del cuadro hemiparkinsoniano ($R = 0,15$). Tampoco se alcanzó significación estadística al compararlo con las puntuaciones medias en cada uno de los signos neurológicos, siendo el mejor índice de correlación obtenido con la motilidad global ($R = -0,45$).

Tabla 16. Coeficientes de correlación entre captación de F-DOPA en estriado lesionado y signos de hemiparkinsonismo en la fase estable, antes del implante del catéter y de la infusión de factores.

	R	p
5-motilidad global	-0,45	0,1
3-uso	0,2	0,48
temblor	0,33	0,24
rigidez	0,05	0,85
bradicinesia	0,3	0,29
severidad	0,27	0,34

No se encontraron diferencias significativas entre la captación en los estriados del lado sano (derecho) (media $0,0025 \pm 0,0002$) y los valores normales. En cuatro ejemplares (iniciales C, G, J y O) se obtuvieron unos índices de captación en el lado sano superiores a los valores medios más dos desviaciones estándar del animal sano. Tres de ellos padecieron episodios de rotación derecha y, concretamente, los ejemplares C y J, que fueron los que en mayor número de ocasiones y con mayor intensidad los sufrieron, tuvieron unos valores de hipercaptación más altos. No hay diferencias significativas entre los valores iniciales medios de captación entre los tres grupos de tratamiento. Los monos que sufrieron un episodio distónico inicial tenían unos valores de captación ($\times 10000$) más elevados ($4.517 \pm 7,5$) que los no distónicos ($2.677 \pm 87,9$), sobre todo los dos que con mayor intensidad la sufrieron (ejemplares G y Q; media $6,44 \pm 42$), pero sin alcanzar significación estadística ($p = 0,9$ y $p = 0,07$, respectivamente).

B.1.c. Características neuroquímicas

Los niveles basales de los metabolitos analizados varían de unos ejemplares a otros. En concreto, el ácido homovanílico (HVA), metabolito de la dopamina, oscila en condiciones basales en un rango entre 17 y 64 ng/ml (media $34,35 \pm 3,79$). Incluso en ejemplares en los que se dispone de más de una determinación inicial, obtenida y

analizada en condiciones semejantes, los niveles oscilan hasta un 370%. Los rangos de oscilación basal de los otros metabolitos analizados no son tan amplios.

El MPTP produce un severo descenso en los niveles de HVA e importante en los de 3-metoxi, 4-hidroxi fenilglicol (MHPG). EL porcentaje medio de disminución del HVA fue un 15% de los niveles basales ($15,06 \% \pm 2,05$) y de MHPG a la mitad ($51,2\% \pm 10,1$). Los valores mínimos de HVA se obtuvieron en general a las dos semanas post-MPTP, pero en algún ejemplar tardó más en producirse el máximo descenso (media $4 \pm 1,22$ semanas). En general coinciden temporalmente los descensos máximos en HVA y en MHPG. Posteriormente se produce una recuperación moderada salvo en dos ejemplares (Q y N), en los que junto a una discreta mejoría en el cuadro, se produjo una recuperación en niveles de HVA hasta prácticamente los valores basales. Los resultados en las distintas determinaciones en la fase de clínica estable son bastante homogéneos en cada ejemplar. En el momento de considerarse estabilizado clínicamente el cuadro y procederse a implantar el catéter, los niveles medios de HVA se encontraban a un 42,28% de los niveles basales (media $12,52 \pm 1,72$). No se encontraron coeficientes de correlación significativos entre los niveles de HVA en el momento de lesión establecida y los valores medios de severidad del cuadro hemiparkinsoniano. Tampoco al correlacionar con cada una de las medias de los parámetros clínicos observados. El coeficiente de correlación más elevado fue con el temblor ($R = -0,3$; $P = 0,32$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje medio de disminución de HVA en monos que presentaron el episodio distónico inicial (porcentaje medio $17,25 \pm 1,02$) y el resto de animales ($14,12 \pm 2,8$). Tampoco se halla significación al comparar los porcentajes de descenso de MHPG (monos con distonía $65,2 \pm 25,5$; resto $41 \pm 7,1$) ni el cociente entre ambos metabolitos (distónicos $4,32 \pm 4,36$; no distónicos $3,73 \pm 2,79$).

B.2. Respuesta a la infusión de factores tróficos/vehículo

B.2.a. Efectos clínicos

Se han realizado en total 129 infusiones. En sólo 5 ocasiones se ha apreciado náuseas y discreto empeoramiento de la motilidad global, que se han recuperado en un período que osciló entre horas y 4 días. Las soluciones infundidas en estos casos

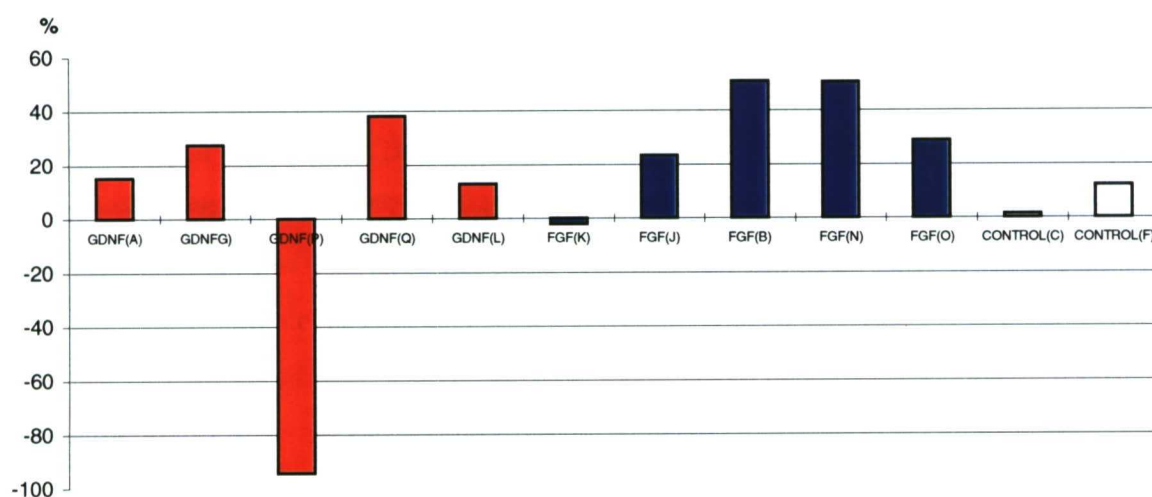
fueron, en tres ocasiones, FGF (todas en el mismo ejemplar, inicial K) y en dos, GDNF (ejemplar G). El volumen infundido fue de 50µl seguidos del volumen muerto del sistema, el mismo que en otras realizadas en esos mismos animales sin que se apreciara empeoramiento. En los últimos seis animales, en los que se emplearon los nuevos catéteres con los que se realizaron 75 infusiones, no se ha producido ninguna complicación inmediata. La infusión de las distintas soluciones no produce variación en los resultados del test de la escalera ni cambio significativo de los índices de rotación cuando se analiza a los animales con apomorfina en el período inmediato postinfusión. No se han presentado, en ningún momento, complicaciones infecciosas.

Considerando como significativo un cambio global mayor del 20% en el ítem denominado severidad, en seis animales hubo una mejoría global, cuatro de ellos tratados con FGF (iniciales J, B, N y O) y dos tratados con GDNF (iniciales G y Q). De los 5 animales tratados con FGF sólo uno no mejoró e incluso empeoró discretamente tras tres infusiones y se deterioró levemente de forma global (inicial K). Cuando se procedió posteriormente al sacrificio, pudo comprobarse que la punta del catéter se encontraba en sustancia blanca profunda del lóbulo frontal, levemente lateral y profundo respecto al estriado, por lo que el factor no había sido liberado en el lugar donde se esperaba su acción. La media de mejoría en el ítem severidad en los animales tratados con FGF fue de un $30,27 \pm 21,94$ (si se elimina el ejemplar de inicial K la mejoría media es de un $38,37 \pm 7,1$). Aunque dos ejemplares mejoraron con la infusión de GDNF, la media global del porcentaje de cambio en este grupo de tratamiento indica un leve deterioro ($-0,12 \pm 24,01$), a expensas sobre todo de un ejemplar (inicial P), que empeoró de forma progresiva y grave (empeoramiento en severidad global de un 94,91 %). En los animales control no hubo un cambio sustancial (media $6,78 \pm 5,3$). Las diferencias en el porcentaje de variación de severidad clínica entre los tres grupos de tratamiento, no son significativas (Figura 14). Los animales que más mejoraron (iniciales B, N, Q y O) no tenían un grado de severidad en la captación en el F-DOPA PET inicial distinto, de forma significativa, al resto. Estos animales tenían un grado de severidad clínica inicial superior al del resto de ejemplares ($7,5 \pm 0,6$ vs $5,1 \pm 0,82$) aunque las diferencias no alcanzan la significación.

En los animales en los que se apreció variación clínica ésta se produjo desde la primera infusión y se mantuvo durante los intervalos interdosas, así como bastante

estable a lo largo del tiempo, solamente en dos ejemplares el cambio fue progresivo (inicial B hacia la mejoría; inicial P empeoramiento).

Figura 14. Porcentaje medio de variación en el grado de severidad del hemiparkinsonismo en cada uno de los 12 animales. Los valores positivos indican mejoría y los negativos, empeoramiento.

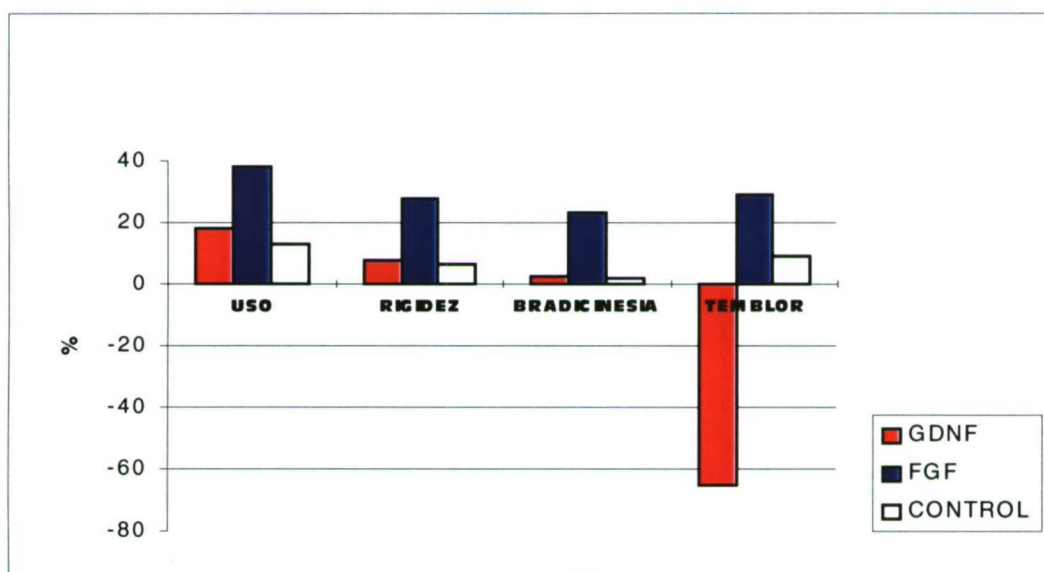


En los seis animales iniciales, en los que se empleó la escala de motilidad global antigua, no se produjeron cambios con el tratamiento debido a la escasa sensibilidad de la escala, motivo por el que, como ha sido comentado, se volvió a definir. En los seis animales finales se observó mejoría sólo en los tres tratados con FGF (porcentaje medio $40,3 \pm 8,7$), mientras que en los infundidos con GDNF la media fue de empeoramiento (porcentaje medio $-32,2 \pm 81,2$), siendo la diferencia entre los dos grupos estadísticamente significativa ($p=0,02$).

También en “uso de la mano” se halló mayor mejoría en los animales tratados con FGF que en los tratados con GDNF y no se apreciaron cambios importantes en el grupo control (medias de los porcentajes de cambio: grupo FGF = $38,1 \pm 1,22$, grupo GDNF = $18,14 \pm 27,7$, grupo control = $12,7 \pm 1,71$). El porcentaje medio de mejoría en

rigidez en los animales tratados con FGF fue de un $27,78 \pm 7,17$ y la variación en el grupo GDNF fue semejante a la apreciada en los controles (grupo GDNF = $7,68 \pm 13,6$; grupo control = $6,7 \pm 0,21$). En bradicinesia, el porcentaje medio de mejoría fue de un $23\% \pm 17,32$, en los animales tratados con FGF, y no hubo prácticamente cambios en los grupos GDNF ($2,66 \pm 36,7$) ni en los controles ($1,7 \pm 19,7$). En temblor mejoró únicamente el grupo FGF ($28,98 \pm 31,9$). En el grupo tratado con GDNF se constató empeoramiento en frecuencia e intensidad del temblor (porcentaje medio de empeoramiento = $-65,5 \pm 64,5$) (Tabla 17). En los animales control no hubo cambios importantes ($9,0 \pm 9,0$). Pese a la gran magnitud de la diferencia en la evolución del temblor en los distintos grupos de tratamiento no se halla significación estadística, debido a la también enorme dispersión de los valores (como ha sido ya referido, hay ejemplares que muestran un temblor intenso y otros que nunca temblaron) (Figura 15).

Figura 15. Porcentaje medio de mejoría en los signos de hemiparkinsonismo en cada uno de los grupos de tratamiento



El número de rotaciones por minuto tras la administración de apomorfina disminuyó en el período de tratamiento (fase pretratamiento: $3,67 \pm 0,84$; fase de tratamiento: $2,57 \pm 0,46$). El porcentaje de disminución en los animales tratados con

FGF fue de un $53,14 \pm 11,02$ y en los controles de un $21,21 \pm 17,02$. En los animales tratados con GDNF la rotación aumentó un $13,95 \pm 20$ ($p=0,04$).

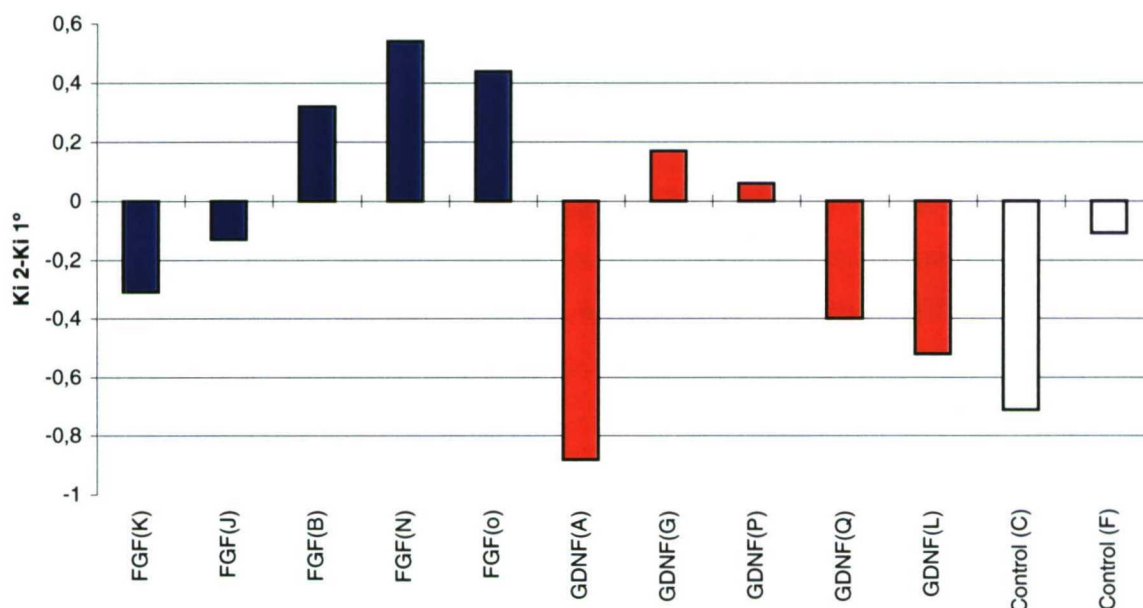
El número de piezas alcanzadas en el test de la escalera aumentó durante la fase de tratamiento (fase pretratamiento: $1,98 \pm 0,51$; fase de tratamiento $2,45 \pm 0,54$). La mejoría en el test de la escalera fue también mayor en los animales tratados con FGF (porcentaje de mejoría en grupo FGF = $127,94 \pm 113$). En el grupo GDNF se objetivó un discreto incremento en el número de piezas alcanzadas (porcentaje: $29,04 \pm 32,5$; grupo control: $2,3 \pm 2,12$) ($p = 0,64$).

Los pesos eran homogéneos en los tres grupos de animales antes de comenzar el experimento. A lo largo del mismo los animales control aumentaron una media de 775 gramos (775 ± 217). En los animales tratados con FGF el incremento medio fue de 440 ± 250 g y en los tratados con GDNF tan sólo de $170 \text{ g} \pm 251 \text{ g}$ ($p = 0,38$).

B.2.b. Efectos sobre la evolución en el PET

La captación media de F-DOPA estriatal en el lado lesionado ($\times 10.000$) en los doce ejemplares empeoró levemente tras el tratamiento (fase pretratamiento: $3,42 \pm 0,7$; posterior al tratamiento: $2,15 \pm 1,38$). En los animales tratados con FGF, la diferencia media indicó mejoría en la captación ($1,75 \pm 1,5$) mientras que en los animales tratados con GDNF y en los controles, empeoramiento (diferencia media en grupo GDNF: $-3,14 \pm 1,9$; en grupo control: $-4,41 \pm 3,3$) ($p = 0,14$) (Figura 16). Si se elimina el animal de inicial K, en el que no se alcanzó la diana anatómica, por lo tanto no es previsible que el FGF haya alcanzado su lugar de acción, la diferencia media en este grupo es de $2,94 + 1,48$ ($p = 0,08$).

Figura 16. Diferencia entre los valores de captación de F-DOPA en estriado lesionado en los distintos ejemplares. Valores negativos indican empeoramiento y valores positivos mejoría en la captación.



El cociente entre la captación en el PET post-tratamiento y el previo (sumando a todos los valores una constante para evitar negativos), indica resultados semejantes: mejoría en la captación en el grupo FGF y empeoramiento en los otros dos grupos, sin alcanzar significación estadística (grupo FGF = $1,23 \pm 0,56$; grupo GDNF = $0,7 \pm 0,18$; control = $0,45 \pm 0,41$) que se alcanza si se elimina el ejemplar K (grupo FGF = $1,42 \pm 0,2$; $p = 0,04$).

En los tres ejemplares en los que se encontró mejoría significativa tras el tratamiento con FGF (iniciales B, N y O) se asoció también mejoría en la captación de F-DOPA en el estriado lesionado. Tras tratamiento con GDNF no ocurrió así: en los dos ejemplares en los que se constató mejoría clínica, en uno mejoró sólo levemente en la captación (inicial G) y en el otro empeoró (inicial Q). En el animal que estando en tratamiento con GDNF se mostró un deterioro importante del estado clínico (inicial P) éste no se acompañó de un descenso en la captación estriatal de F-DOPA.

No hay correlación significativa entre la variación en la severidad clínica y la diferencia en la captación estriatal de F-DOPA en el lado lesionado ($R = 0,19$). Analizándolo exclusivamente en el grupo FGF la correlación roza la significación estadística ($R = 0,89$, $p = 0,06$).

La captación final de F-DOPA en el estriado lesionado no se correlaciona significativamente con la severidad del cuadro clínico ($R = 0,13$, $p = 0,67$) ni con la tasa de rotación en la fase de tratamiento ($R = -0,41$, $p = 0,2$).

Los coeficientes de captación ($\times 10.000$) medios en el estriado sano no variaron tras el período de tratamiento (media pretratamiento = $24,99 \pm 2,2$; tras tratamiento = $24,40 \pm 2,0$).

B.2.c. Efectos neuroquímicos

Los niveles medios de HVA en LCR durante la fase de tratamiento aumentaron (fase pre-tratamiento $12,52 \pm 2,01$, fase post-tratamiento $17,09 \pm 1,7$). Los porcentajes medios de variación fueron muy dispares, siendo la media de un $52,6 \pm 10,5$. El incremento fue mayor en los animales tratados con FGF ($73,8 \pm 18,1$) que en los tratados con GDNF ($42,28 \pm 13,1$) y que en los controles ($25,26 \pm 19,1$) ($p = 0,4$). No existe correlación significativa entre los niveles de HVA durante la fase de infusión y la captación final de F-DOPA en el estriado lesionado ni tampoco con la severidad del cuadro hemiparkinsoniano en la fase de tratamiento.

Tabla17. Tabla resumen de los porcentajes de variación en determinaciones clínicas y analíticas obtenidos con la infusión de factores o vehículo en los distintos grupos de tratamiento. Valores positivos indican mejoría y negativos empeoramiento.

	SEV (%)	MG (%)	USO (%)	RIG (%)	BRA (%)	TEM (%)	ROT (%)	ESC (%)	PESO (gr)	PET (dif)	HVA (%)
FGF	+30,3	+40,3	+38,1	+27,8	+23	+28,9	+53,1	+128	+440	+1,75	+73,8
FGF*	+38,4	+38,3	+45,6	+29,3	+33,7	+22,3	+52,5	+183	+585	+2,82	+85,3
GDNF	-0,12	-32,2	+18,1	+7,7	+2,6	-65,5	-13,9	+29	+170	-3,14	+42,3
CONTROL	+6,8	n.a.	+12,7	+6,7	+1,7	+9	+21,2	+2,3	+775	-4,41	+25,3
P	0,36	0,02*	0,71	0,35	0,85	0,39	0,04*	0,64	0,38	0,14	0,84

FGF*: Grupo FGF eliminando los datos del animal en el que el catéter no se localizó de manera precisa (inicial K).

Sev: severidad; MG: motilidad global; Uso: uso de la mano; Rig: rigidez; Bra: bradicinesia; Tem: temblor; Rot: rotación tras apomorfina; Esc: test de la escalera; PET (dif): diferencia en la captación estriatal de F-DOPA; HVA: ácido homovanílico.

B.2.d. Efectos morfológicos.

En el examen macroscópico de los cerebros de los animales sacrificados no se ha encontrado ni hidrocefalia ni tumores. Es frecuente la presencia de zonas de coloración rojizo pardusca a lo largo del trayecto del catéter, sugerentes de ser restos de pigmentos férricos secundarios a leves hemorragias. En el ejemplar de inicial C, como ha sido ya descrito, se observó en lóbulo temporal izquierdo una cavidad quística rodeada de tejido reblandecido, compatible con infarto en fase crónica. En este ejemplar, tratado con vehículo, además, en la zona final del catéter (globus pálido) se encontró una pequeña cavidad de 3 mm de diámetro rodeada de tejido pardusco probablemente secundaria a hemorragia. En un animal tratado con GDNF (inicial G) en el momento del sacrificio se pudo observar que el catéter estaba recubierto, en todo su trayecto, de una fina capa de tejido fibroso de coloración blanquecina que al llegar a la zona distal se engrosaba formando una esfera compacta de 4 mm. de diámetro alojada en el putamen. El tejido cerebral que rodeaba esta esfera estaba distorsionado y era de coloración marronácea.

La localización de la punta del catéter no era la idónea en los seis primeros ejemplares. En el de inicial K, el trayecto era anterior y profundo, como ya ha sido descrito, y en el de inicial F (control) quedó emplazado demasiado superficial. En otros (iniciales A, C y J), aunque discretamente profundos, el recorrido atravesó el putamen.



En los 6 últimos animales sacrificados (iniciales B, P, Q, N, Q, O) sí se alcanzó con precisión la diana anatómica.

En la sustancia nigra ipsilateral al lado perfundido con MPTP se encuentra una deplección de neuronas inmunorreactivas a la tirosin hidroxilasa (Tabla 18). Existe gran variabilidad en el número de neuronas presentes en los distintos ejemplares, tanto en el lado sano como en el afecto. Como promedio se encuentra una disminución a un tercio del número de neuronas encontrado en el lado contralateral, sin predominio claro de la deplección a uno de los tres niveles analizados (rostral, medio y caudal). No hay diferencias significativas en el número de neuronas TH+ en el lado sano entre los grupos de tratamiento a ninguno de los niveles estudiados. Por problemas técnicos, no se dispone en el momento actual de los resultados histológicos de los dos animales control, pero sí de experimentos previos (De Yébenes y cols., 1998) que emplearon la misma dosis de MPTP intracarotídeo (media en lado lesionado = $297,3 \pm 31,1$, en lado sano = $673,3 \pm 112,9$, cociente = $2,26 \pm 0,55$).

La media del número de neuronas TH+ en el lado lesionado presentes en todos los cortes de animales tratados con FGF, es significativamente mayor que la de animales tratados con GDNF (grupo FGF = $139 \pm 10,6$; GDNF = $92 \pm 12,3$; $p = 0,04$) (Figura 17). Esta diferencia sería aun mayor si se eliminara al ejemplar K, dado que es el que menor número medio de neuronas TH+ tiene en el denominado grupo FGF. Las diferencias no son significativas si sólo se realizan las comparaciones a los distintos niveles. Las medias de los cocientes de los distintos ejemplares tratados con FGF y GDNF no son estadísticamente diferentes (grupo FGF = $3,08 \pm 0,3$; grupo GDNF = $3,83 \pm 0,5$).

Tabla 18. Número de neuronas inmunorreactivas a la tirosin hidroxilasa en los distintos niveles de la sustancia nigra del lado lesionado con MPTP y del lado sano en los animales tratados con FGF, GDNF o vehículo.

Inicial	Tto	SN TOTAL			SN ROSTRAL			SN MEDIO			SN CAUDAL			media Lles
		Lles	LN	coc	Lles	LN	coc	Lles	LN	coc	Lles	LN	coc	
K	FGF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	111	565	5,1	110	334	3,0	110
J	FGF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	245	514	2,1	101	311	3,1	173
B	FGF	409	1301	3,2	68	314	5	109	400	4	232	587	2,5	136
N	FGF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	222	638	2,9	75	121	1,6	148
O	FGF	340	891	2,6	30	71	2,4	90	280	3,2	220	540	2,5	113
media		374	1096	2,9	49	192	3,7	155	479	3,4	147	378	2,5	136*
e.s.m		34,5	205	0,3	2	121	1,3	51	100	0,8	51	134	0,41	11,6
A	GDNF	n.d.	n.d.	n.d.	68	378	5,5	102	342	5,5	n.d.	n.d.	n.d.	85
G	GDNF	117	495	4,2	52	118	2,3	71	146	2,04	63	230	3,6	62
P	GDNF	244	1015	4,1	85	201	2,4	51	29	5,8	107	518	5,0	81
Q	GDNF	345	1191	3,5	39	125	3,2	166	42	2,6	139	604	4,3	114
L	GDNF	416	1371	3,3	119	233	2,0	181	704	4,0	116	434	4	138
media		280	1018	3,7	72,6	211	3,08	114	252	3,9	106	446	4,22	96*
e.s.m		8,5	267	0,3	22	75	1,22	40,4	199	1,13	21,9	113	0,3	13,3

Lles: lado lesionado; LN: lado normal; coc: cociente lado normal/ lado lesionado; * $p < 0,05$.

No se encuentra una correlación entre el número de neuronas TH+ presentes en la sustancia nigra y la severidad del cuadro parkinsoniano ($R = -0,17$; $p = 0,6$). El ejemplar con el cuadro más severo (inicial P) es en el que se encuentra menor número de neuronas TH en el lado lesionado (media 81) pero curiosamente en el ejemplar J, con intenso parkinsonismo, es el de mayor media de neuronas TH+ presentes (173). Tampoco hallamos correlación significativa entre el número medio de neuronas TH+ presentes y la captación estriatal de F-DOPA tras el tratamiento ($p = 0,8$). Al analizar los niveles de HVA se encuentra correlación significativa con el número de neuronas TH nigricas en el lado lesionado ($R = 0,7$; $p = 0,02$) y no con el número en lado sano.

En el estriado del lado lesionado se evidencia una menor densidad de terminales dopaminérgicas que en el sano, siendo ésta más evidente a nivel putaminal (Tabla 19). A nivel microscópico, en la zona adyacente al tracto del catéter, se observa infiltrado inflamatorio crónico y gliosis sin claras diferencias entre los grupos de tratamiento y ocasionales depósitos férricos (ejemplares G y C). No hay imágenes de atipias nucleares ni neoformaciones vasculares.

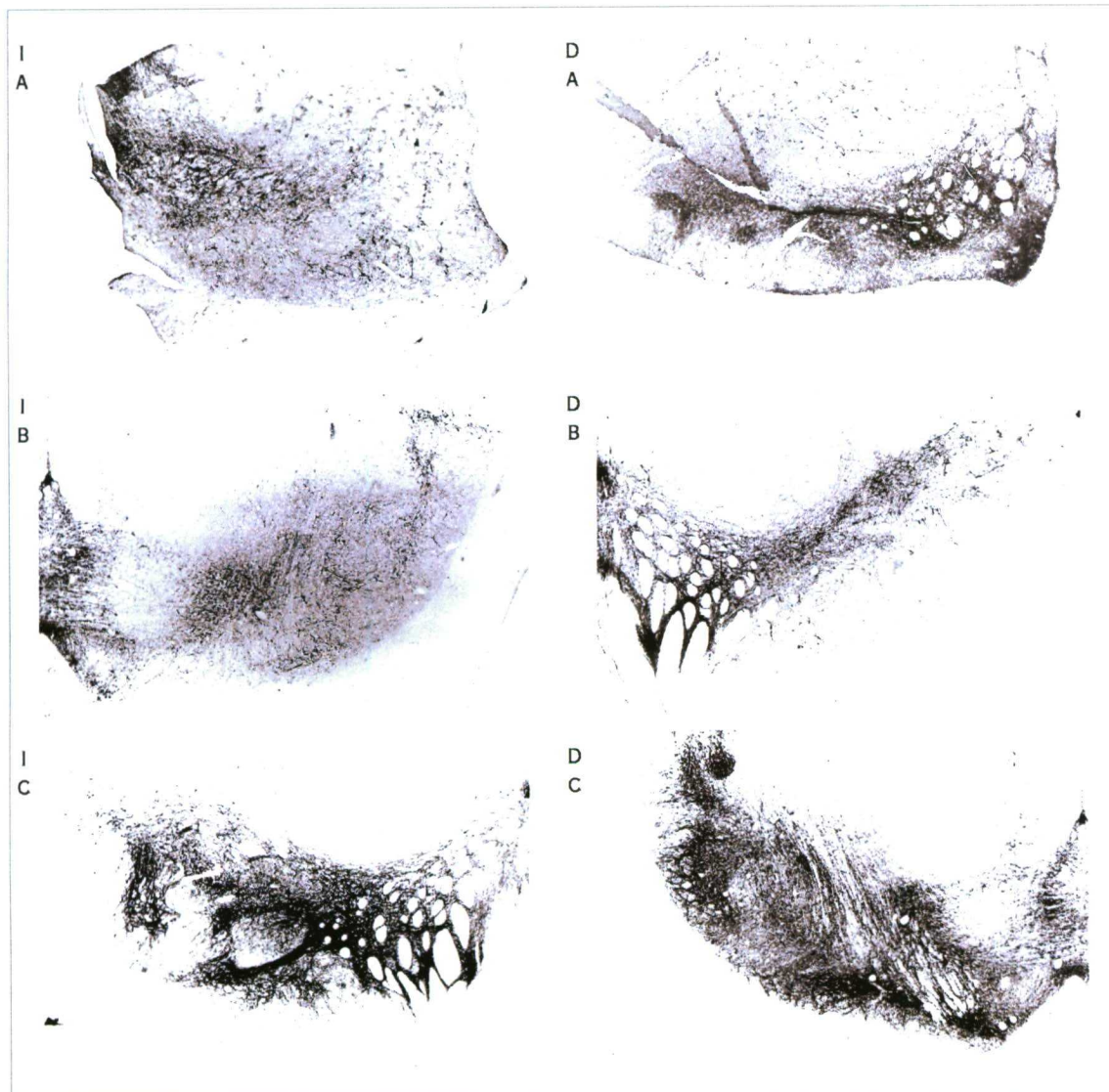
Tabla 19. Densidad de terminales y número de neuronas inmunoreactivas a la tirosin hidroxilasa en distintas zonas de los estriados de los primates tratados con factores tróficos o controles.

		ESTRIADO LESIONADO						ESTRIADO SANO					
		Accumbens		Caudado		Putamen		Accumbens		Caudado		Putamen	
Inicial	Tto.	Dens	Nº	Dens	Nº	Dens	Nº	Dens	Nº	Dens	Nº	Dens	Nº
K	FGF	I	5	I	0	I	0	III	0	III	0	III	0
J	FGF	III	1	I	2	I	3	III	4	III	8	III	12
B	FGF	III	2	II	2	I	2	III	4	III	4	III	4
N	FGF	III	22	II	0	II	1	III	0	III	2	III	0
O	FGF	II	0	I	6	I	8	III	13	III	4	III	9
A	GDNF	III	7	II	2	I	2	III	3	III	0	III	4
G	GDNF	n.d.	n.d.	I	0	I	0	III	0	III	9	III	0
P	GDNF	n.d.	n.d.	I-II	14	I	3	n.d.	n.d.	III	16	III	9
Q	GDNF	III	0	I	14	I	3	III	1	III	0	III	0
L	GDNF	n.d.	n.d.	II	2	II-III	7	n.d.	n.d.	III	4	III	3
C	Control	III	0	I	0	I	1	III	0	III	2	III	0
F	Control	n.d.	n.d.	II	3	II	7	n.d.	n.d.	III	2	III	8

Dens: Densidad de fibras (I: muy disminuida; II: disminuida; III: normal), n.d.: no disponible.

No hay diferencias significativas en el número de neuronas inmunorreactivas a la TH en estriado lesionado respecto al sano (lesionado $3,7 \pm 1,2$; no lesionado $3,7 \pm 0,7$). No hay diferencias significativas en el número medio de neuronas estriatales TH+ entre los tres grupos (FGF: $4,08 \pm 1,76$; GDNF: $4,9 \pm 1,52$; control: $2,92 \pm 1,3$), aunque sí una tendencia a ser más frecuentes en los animales tratados con factores tróficos que en los controles (Figura 18). Tampoco hay correlación significativa entre el número de neuronas nigricas y el de neuronas estriatales inmunorreactivas a la TH ($p = 0,97$). El número medio de neuronas inmunoreactivas a la TH en el estriado sano de animales que presentaron episodios de rotación contralateral espontánea ($7 \pm 1,62$) es superior, de manera significativa, al de los animales que no las exhibieron ($2,9 \pm 0,68$) ($p = 0,01$). Los animales con mayor grado de severidad clínica tienen un mayor número de neuronas TH estriatales, aunque no de manera significativa, que los de un cuadro más leve ($29,2 \pm 4,9$ vs $14,6 \pm 3,5$, $n = 6$ por grupo). Los animales que mostraron movimientos anormales tras la administración de apomorfina no se diferencian significativamente del resto en cuanto al número de neuronas TH+ presentes en el lado lesionado, ni en el grado de asimetría con respecto al lado sano (tanto a nivel nigrico como estriatal).

Figura 17. Neuronas inmunoreactivas a tirosin hidroxilasa (TH) en sustancia nigra de monos hemiparkinsonizados infundidos con vehículo o factores tróficos.
Microfotografías de secciones de mesencéfalo con inmunotinción para TH.



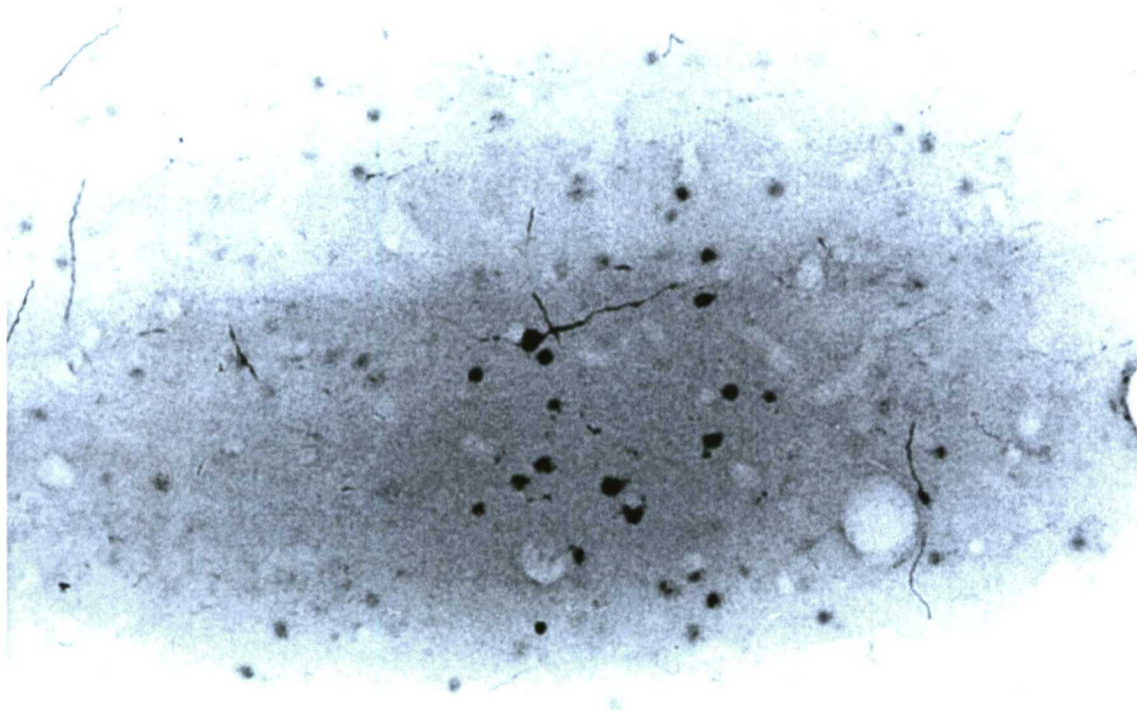
Las fotografías de la izquierda, marcadas con I, corresponden al lado lesionado e infundido. Las fotografías de la derecha, marcadas con D, corresponden al lado no lesionado ni infundido.

A: animal infundido con vehículo

B: animal infundido con GDNF

C: animal infundido con FGF

Figura 18. Célula estriatal intrínseca y neuritas inmunoreactivas a la tirosin hidroxilasa (TH) en un mono hemiparkinsonizado e infundido con FGF.
Microfotografía de sección de estriado con inmunotinción para TH.



V. DISCUSION

A. Experimento 1. Efecto neuroprotector del MCG frente a la lesión por 6-OH-DA en ratas.

Estos experimentos demuestran que el MCG protege de los efectos bioquímicos y comportamentales producidos por lesiones unilaterales por 6-OHDA y promueve la recuperación de la degeneración dopaminérgica establecida. Confirma “in vivo” las propiedades neuroprotectoras y neurotróficas del MCG sobre neuronas dopaminérgicas descritas “in vitro”.

El efecto protector es demostrado por la diferencia entre niveles de catecolaminas en estriado en animales tratados con MCG simultáneo a la administración de 6-OHDA frente a los observados en los tratados con MD o vehículo. La inyección de 6-OH-DA en el fascículo longitudinal medial produce lesiones de severidad variable. Se obtienen animales con una denervación severa en el 25-50% de los ejemplares, definida como una deplección de DA estriatal mayor del 90% y un número mayor de 3 vueltas por minuto tras apomorfina subcutánea. Existe gran variabilidad interindividual tanto en niveles de DA estriatal como en intensidad de la rotación. En los animales tratados con MCG se encontraron mayores concentraciones estriatales de DA con significación estadística pero, aunque los animales tratados con MCG rotaban menos que el resto, las diferencias no alcanzaron la significación.

El MCG es rico en moléculas con propiedades antioxidantes. Las células gliales reducen los niveles de especies oxidativas citotóxicas (Mena y cols., 1996) y producen moléculas con propiedades antioxidantes como el glutatión (Damier y cols., 1993; Slivka y cols., 1987). La MAO-B glial puede catabolizar la DA evitando así el daño producido por la autooxidación de la DA en el citoplasma neural hacia neuromelanina con producción de radicales libres. Este mecanismo probablemente no jugara un papel importante en la protección neural ya que en el momento de la inyección la actividad tanto MAO-A como MAO -B estaban totalmente bloqueadas por el pretratamiento con pargilina. Por otro lado, la MAO puede incrementar la producción de H₂O₂. El efecto protector del MCG sobre neuronas dopaminérgicas recae en muchos compuestos, pero Mena y cols. (1997)

mostraron que el papel más importante lo juegan moléculas de pequeño tamaño, como el ácido ascórbico y el glutathione, con propiedades antioxidantes, más que por los factores tróficos de naturaleza peptídica. Es interesante que el efecto protector se evidencie siendo infundido el MCG en estriado y la 6-OHDA en el fascículo longitudinal medial. Por ello, el efecto protector no es debido a reducción local del potencial redox de la 6-OHDA sino a un incremento de la resistencia antioxidante en las neuronas DA nigroestriales. Esas propiedades antioxidantes están mediadas por determinados compuestos que incluyen los factores neurotróficos. Así Nistico y cols. (1992) encontraron que el NGF aumenta la actividad de la superóxido dismutasa y otras enzimas anti radicales libres.

El efecto restaurador del MCG en lesiones establecidas por 6-OHDA es aún más interesante. La recuperación de niveles de DA fue proporcionalmente mayor en el sistema límbico que en el estriado, lugar donde fue inyectado. La inyección de 6-OHDA en el fascículo longitudinal medial produce una mayor deplección de DA en estriado que en el sistema límbico y es posible que, con una disminución media de DA de un 98.2 % respecto a controles, la lesión sea tan severa que alcance un efecto suelo mientras que en el sistema límbico, con una deplección media de un 88%, sea más probable la recuperación. Los datos sugieren que el MCG es más efectivo en áreas con denervación dopaminérgica parcial que en aquellas con una lesión completa. La reducción en la rotación inducida por apomorfina concuerda con la recuperación parcial en los niveles de DA.

La recuperación de la lesión DA por el MCG administrado más de 4 semanas después de la inyección de 6-OH-DA sugiere que el MCG es rico en factores tróficos. Las células gliales producen diferentes factores neurotróficos que modulan el desarrollo, la supervivencia, la extensión de las neuritas y la resistencia a neurotoxinas de las neuronas dopaminérgicas (Nistico y cols., 1992; Takeshima y cols., 1994a y b; Mena y cols., 1997; Lin y cols., 1993; Muller y cols., 1995). Los factores neurotróficos secretados por la glía incluyen GDNF (Lin y cols., 1993), bFGF (Beck y cols., 1993; Otto y cols., 1990, 1993 y 1994; Mena y cols., 1995), BDNF (Batchelor y cols., 1998), NGF (Engle y cols., 1991), IL-1, PDGF (Richardson y cols., 1988) y posiblemente más. Otros estudios probaron los efectos neurorrestauradores de factores neurotróficos secretados por la glía como FGF y

GDNF. Una inyección supranigral única de GDNF en ratas lesionadas por 6-OHDA aumenta los niveles de DA, el número de neuronas expresando TH, el número de neuritas TH+ y los niveles de actividad TH en la nigra (Bowenkamp y cols., 1995; Lapchak y cols., 1997) y disminuye la rotación inducida por apomorfina (Hoffer y cols., 1994). En el ratón con lesión dopaminérgica provocada por la administración sistémica o estriatal de MPTP, la inyección de GDNF en nigra aumenta los niveles mesencefálicos de DA y mejora el estado motor (Tomic y cols., 1995). También el GDNF ha demostrado efectos protectores contra la lesión por 6-OH-DA (Kearns y cols., 1997) y por metamphetamine (Cass y cols., 1996) en roedores. Los estudios in vitro con MCG demuestran que su efecto neurotrófico sobre neuronas dopaminérgicas es mayor que el de cualquier factor secretado por la glía conocido a las concentraciones que se esperan en el MCG (Mena y cols., resultados sin publicar). Por ello es posible que el MCG contenga un factor trófico dopaminérgico aún desconocido y más potente que los descritos. Otra posibilidad es que su gran efectividad dependa de una adecuada combinación de factores neurotróficos conocidos y agentes reductores.

Los animales tratados con MCG mostraron mayor supervivencia frente a la infección pero mayor pérdida de peso que los controles. La ingesta alimenticia depende de la actividad dopaminérgica, principalmente de la vía tuberoinfundibular (Ungerstedt, 1971b). El GDNF reduce la ingesta de alimentos y produce pérdida de peso quizás debido a su acción sobre las neuronas hipotálamicas dopaminérgicas (Lapchak y cols., 1997b).

Nuestros resultados prueban que el MCG es una mezcla de sustancias con potentes propiedades neuroprotectoras y neurorestauradoras que actúa selectivamente sobre neuronas dopaminérgicas in vivo. La administración intraestriatal de MCG duplica los niveles de DA estriatales y los cuadruplica en sistema límbico en ratas lesionadas con 6-OH-DA. La inyección única previene de la toxicidad de la 6-OHDA sobre el sistema dopaminérgico, evitando la deplección de DA y de sus metabolitos en estriado. El MCG puede suponer una fuente nueva, potente y barata de agentes terapéuticos para la enfermedad de Parkinson.

B. Experimento 2. Estudio de la tolerancia y eficacia de la infusión de FGF y GDNF en monos con hemiparkinsonismo inducido por MPTP

B.1. Caracterización del modelo animal

El modelo de hemiparkinsonismo en primates mediante inyección intracarotídea de MPTP no es homogéneo ni totalmente predecible. Los monos son animales de comportamiento complejo, con grandes diferencias entre los ejemplares. Los hay temerosos y los hay agresivos, algunos se relacionan más con los cuidadores y aprenden antes, unos utilizan más las dos manos para comer y otros tienden a hacerlo con una, cada uno tiene sus preferencias alimenticias. Su comportamiento puede variar en función del vecino de jaula, del cuidador o de otros cambios ambientales. Por lo tanto son múltiples las variables que hay que tener en cuenta y largas las horas de observación antes de establecer una conclusión. Por otro lado, y no sólo pese a la posible variación subjetiva interindividual, los fenómenos clínicos objetivos secundarios a la administración de MPTP tampoco son homogéneos. La explicación del porqué algunos ejemplares desarrollan distonía o temblor y otros no, del porqué algunos adoptan una postura del miembro superior en flexión, sólo un subgrupo tiene episodios de rotación intensa contralateral, no es conocida. Pese a que con la administración carotídea del MPTP se obvian determinadas variaciones farmacocinéticas que pueden condicionar un diferente acceso de la toxina al cerebro, también ocurre como en los modelos obtenidos por administración sistémica, que la severidad del cuadro hemiparkinsoniano es muy variable. Revisando las imágenes arteriográficas, no hay diferencias en cuanto al lugar de liberación de la toxina respecto a distancia de ramas colaterales por las que el tóxico pueda dispersarse, que lo puedan explicar. La toxicidad por MPTP se ha relacionado con la edad del animal, siendo más resistentes animales jóvenes en los que hay menor presencia de MAO y de neuromelanina. En nuestros animales tampoco hay diferencias en edad entre los que desarrollan una clínica más o menos severa. La gran variación basal en los niveles de HVA hizo pensar que quizás un mayor indicador de transmisión dopaminérgica inicial condicionara una mayor resistencia a desarrollar

hemiparkinsonismo tras la inyección de MPTP, pero no se corroboró esta hipótesis. Probablemente dependa de factores genéticos como polimorfismos en los genes de los transportadores de dopamina o relacionados con algunos de los genes implicados en parkinsonismo familiar en humanos o de bien de variaciones anatómicas, como lo puede indicar la gran variabilidad en el número de neuronas TH+ en el estriado sano.

Esta variación inicial en el cuadro hace que las medidas de dispersión sean muy altas para poder obtener significación estadística al analizar los datos. También impide el análisis en términos absolutos y obliga a comparar variaciones en cada animal. No puede esperarse tampoco igual eficacia de un tratamiento en animales con cuadros de gravedad tan dispersa. Pero la caracterización precisa del cuadro previo al tratamiento desde el punto de vista clínico, radiológico y neuroquímico sí ha permitido apreciar diferencias importantes. En general, existe un predominio del parkinsonismo en miembro superior donde además es más fácil la evaluación. También es más frecuente en miembro superior la presencia de distonía y de temblor, mientras que cuando aparecen movimientos anormales lo hacen generalmente afectando al miembro inferior. Alteraciones posturales y de la estabilidad sólo fueron apreciables de forma tardía en el ejemplar de inicial P que sufrió un cuadro de deterioro grave y progresivo. Las vocalizaciones, características de cada animal tanto en frecuencia como en tono, no variaron claramente tras la lesión con MPTP ni tampoco durante la fase de tratamiento.

Debido a que en la literatura previamente publicada no sólo varía la especie de macaco sino dosis empleadas, edades, pesos, metodología, no se pueden establecer comparaciones concretas con nuestro modelo, aunque en general son concordantes.

El cuadro de distonía aguda por MPTP no ha sido descrito previamente de manera concreta y tan amplia como el parkinsonismo típico. El término distonía puede emplearse para designar a determinadas contracciones involuntarias o posturas anómalas, como definición de un síndrome o enfermedad caracterizado por el cuadro descrito. En humanos puede ser de origen desconocido, debido a un defecto en la producción de DA de origen genético (defectos en las enzimas de síntesis en la denominada “distonía que responde a L-DOPA”) o ser secundario, por ejemplo, a infartos en ganglios basales, al uso de fármacos

bloqueantes de los receptores de DA o de levodopa en pacientes con lesión dopaminérgica. La base neuroquímica no es conocida pero, de lo descrito anteriormente, se desprende que se ha asociado tanto a un déficit como a un exceso de transmisión dopaminérgica. También se ha relacionado con un desbalance entre transmisión noradrenérgica y dopaminérgica. En un paciente con distonía craneal se objetivaron niveles descendidos de homovanílico en LCR (Ashizawa y cols., 1980) y también en un paciente con distonía generalizada se encontró disminución de DA estriatal (Hornykiewicz y cols., 1986). Nuestros datos no pueden apoyar ninguna de estas hipótesis puesto que no encontramos diferencias en cuanto a niveles ni en proporciones de descenso en los metabolitos entre monos distónicos y no distónicos, aunque la tendencia es que en los monos distónicos el porcentaje de descenso del MHPG es mayor. Es obvio que los niveles en líquido cefalorraquídeo no permitan tampoco extrapolar conclusiones de lo que pueda ocurrir en el estriado lesionado, puesto que sus niveles pueden depender de múltiples zonas cerebrales, sobre todo del estriado sano, y de su aclaramiento. Únicamente el curioso caso en el que se producía la postura distónica tras un estímulo estresante del animal, puede hacer relacionar la distonía con un incremento de los niveles sistémicos de catecolaminas. Perlmutter y cols. (1997), aunque sin hallar diferencias en niveles estriatales de dopamina respecto a los animales no distónicos lesionados con MPTP, sí demostraron una menor unión a receptores dopaminérgicos en putamen en monos sacrificados en el periodo distónico. Observaron una disminución transitoria de receptores D2 que coincidió temporalmente con el período distónico en animales lesionados de manera semejante a los del presente experimento. Ellos asociaron la presencia de distonía con una edad inferior de los animales, dato no corroborado en nuestro estudio. En un mono con severo cuadro distónico durante los tres primeros meses post MPTP se objetivó usando como ligando raclopride una hiperregulación de receptores D2 de aproximadamente un 50% al segundo día post MPTP (Leenders y cols., 1988). Son múltiples los mecanismos compensatorios que se establecen tras el insulto por MPTP y resulta pues difícil a cual atribuir el desarrollo del fenómeno clínico. En nuestro experimento, los animales distónicos no muestran una captación de F-DOPA en el PET pretratamiento significativamente mayor, pero éste fue realizado tiempo después de finalizada la fase distónica, aunque es de destacar que los dos animales que

sufrieron el cuadro distónico más severo fueron en los que la captación inicial en el PET en el lado lesionado fue mayor. La distonía en nuestros animales en esos momentos iniciales puede obedecer a que el tóxico produce una degradación masiva aguda de neuronas dopaminérgicas, con liberación de dopamina que alcanza ya unos receptores estriatales modificados por el MPTP y por eso ser semiológicamente semejante a lo que posteriormente ocurre al administrar el agonista dopaminérgico. El período en el que aparece el cuadro de distonía corresponde con el tiempo en que, tras la administración de MPTP, se encuentra una hipercaptación estriatal en los estudios PET (Burns y cols., 1983; Chiueh y cols., 1984).

La rotación mediada por agonistas dopaminérgicos es un indicador proporcional del grado de severidad de la lesión nigroestriatal en roedores. En primates, al igual que otros signos clínicos, la valoración e interpretación es más complicada. Algunos ejemplares aprendieron cómo sujetarse para evitar la rotación otros, severamente lesionados, no mostraban comportamiento rotatorio por la presencia de una severa distonía generalizada. Por esto, la intensidad de la rotación no es un indicador fiable y no se correlaciona con la severidad del cuadro. Tampoco la tasa de rotación ipsilateral espontánea es proporcional a la severidad de la clínica: animales severamente afectados pueden rotar mucho por la disminución de movimiento en las extremidades afectas o, por el contrario, poco si predomina un cuadro global de acinesia. Sin embargo puede ser un índice válido de cambio en la valoración clínica de un ejemplar.

No hay descripciones previas de los episodios espontáneos de rotación ipsilateral semejantes a los observados tras la administración de apomorfina. En nuestro experimento no ocurren en monos con un cuadro de diferente severidad al resto. Puede especularse que en ocasiones son episodios de activación asimétrica asociados a liberación de catecolaminas por estrés. Al asociarse a valores de captación más elevados en el estriado sano puede sugerir que esa asimetría, quizás resultado de un intento compensatorio, fuera más fácilmente descompensable desde el punto de vista clínico y favorecer la rotación. La captación elevada en estos animales concuerda con una significativa mayor presencia de neuronas inmunorreactivas a la TH en el estriado sano. El incremento evidenciado en la

presencia de estas neuronas en monos parkinsonizados respecto a sanos también hace pensar en una reacción compensatoria (Betarbet y cols., 1997).

La interpretación del test de la escalera no puede realizarse tampoco sólo como el término absoluto de número de piezas alcanzadas. Algunos ejemplares nunca se acercaron al panel por ser más temerosos, otros desarrollaron trucos para poderlo hacer con la mano sana, animales severamente afectados continuaban alcanzando más piezas que otros en mejor estado clínico, pero creemos haber diseñado una prueba válida puesto que al exigir un movimiento preciso permite valorar adecuadamente la velocidad, precisión y la presencia de temblor.

De manera precoz, tras repetidas administraciones de apomorfina, seis animales desarrollan discinesias al igual que ocurre en los pacientes con EP tratados con L-DOPA u agonistas dopaminérgicos. En humanos con parkinsonismo severo inducido por MPTP las discinesias aparecen de manera precoz tras el inicio de la terapia con L-DOPA apoyando, la teoría de que estas discinesias son más producto de la degeneración dopaminérgica que del tratamiento prolongado con L-DOPA (Langston y col. 1984). En monos lesionados con MPTP la aparición de discinesias inducidas por L-DOPA dependen del grado de lesión nigroestriatal, desarrollándolas antes los animales más severamente lesionados (Sneider y col., 1989). Son más frecuentes tras tratamiento con L-DOPA que con agonistas dopaminérgicos y, dentro de este grupo, inducen más rápidamente y con mayor intensidad las discinesias los agonistas de menor vida media, como la apomorfina. En nuestro estudio ocurrieron en animales con índices de severidad muy dispares, pero siempre en unos tiempos similares, con frecuencia tras doce dosis de apomorfina. El momento de aparición de discinesias en modelos experimentales es muy variable puesto que son diferentes las formas y vías de administración de diferentes agonistas, bien solos, bien asociados a L-DOPA, en los estudios previamente publicados (Boyce y cols., 1990; Page y cols., 1993). Son descritas desde las dos semanas de uso de apomorfina y en esos experimentos también predominan las formas coreicas en miembro inferior coincidiendo con el periodo de mayor eficacia de la medicación (Boyce y cols., 1990, Page y cols., 1993). La relación entre la aparición de discinesias por apomorfina con mayor intensidad y frecuencia en los ejemplares que padecieron distonía en el periodo agudo post MPTP no ha sido previamente

publicada. En un ejemplar (inicial Q) incluso eran de características semiológicas semejantes. Se piensa que en la aparición de discinesias en la EP, la activación de D1 juega un papel primordial, aunque el estímulo D2 también parece participar en estas respuestas (Mouradian y cols., 1989, Luquin y cols., 1992). En modelos experimentales se ha relacionado la presencia de respuesta discinética a la L-DOPA con una disminución en el número de receptores opioides (Piccini y cols., 1997) y a un aumento de la captación de 2 deoxi glucosa en caudado, putamen y pálido (Mitchell y cols., 1990). En nuestro estudio no se encontraron diferencias en los hallazgos en el PET ni en datos anatomopatológicos en los animales que las presentaron.

En base a datos del F-DOPA PET, el modelo consigue una degeneración dopaminérgica severa y unilateral. No se observan diferencias globales en la captación en el lado sano respecto a los obtenidos en el mono sin lesionar. Nuestro grupo previamente realizó un experimento en animales de la misma especie y edad y empleando las mismas dosis de MPTP, sólo que administrado en ese caso mediante disección de carótida interna con clamplaje de la externa (de Yébenes y col., 1998). En el PET realizado a los seis meses sí se encontró disminución de la captación en el estriado sano, aunque la comparación en términos absolutos no es posible ya que en esa ocasión los animales fueron pretratados con un inhibidor de la COMT. Por ello, la administración mediante cateterismo desde región femoral con control arteriográfico puede permitir mayor selectividad para precisar la liberación a nivel intracraneal y obtener un modelo unilateral donde el hemicuerpo no afecto sirva de referencia para la valoración clínica del hemiparkinsonismo. Incluso en algunos ejemplares se constataron unos valores de captación elevados en el lado sano que orientan a que se establecen unos mecanismos compensatorios. No existen muchos estudios previos mediante F-DOPA PET en primates y, al no coincidir las especies, las dosis ni los tiempos, las comparaciones absolutas no son válidas (Burns y cols., 1983; Chiueh y cols., 1984; Pate y cols., 1993; Schneider y cols., 1995; Melega y cols., 1996; Eberling y cols., 1997).

El no encontrar correlación entre índices de captación y la severidad, probablemente oriente a que en este modelo complejo la clínica no sea únicamente proporcional a la

degeneración dopaminérgica nigroestriatal y que se hallan otros sistemas implicados.

También puede deberse a la diversidad de la severidad lesional.

Desde el punto de vista neuroquímico nuestros datos concuerdan con lo previamente publicado en roedores, tanto en niveles de metabolitos como en los períodos de mayor descenso. En primates, las determinaciones de metabolitos de monoaminas en líquido cefalorraquídeo son escasas y los métodos, modelos y tiempos no coinciden con los de nuestro experimento (Blanchet y cols., 1998). Como ya ha sido mencionado los niveles de DOPAC y HVA en LCR lumbar no reflejan de forma adecuada los niveles de dopamina estriatales (Jenner y cols., 1984) y la disminución y posterior recuperación sin observarse mejoría motora, apuntan como causa al efecto del MPTP como inhibidor irreversible de la monoaminooxidasa. El no encontrar relación con la severidad del cuadro clínico puede también ser debido a la gran oscilación experimentada en condiciones basales, ya descritas.

B.2. Respuesta a la infusión de factores tróficos.

En este experimento, la infusión intraestriatal de FGF durante seis meses en primates hemiparkinsonizados, produce mejoría en los parámetros clínicos observados (severidad global, motilidad global, bradicinesia, rigidez, temblor, rotación por apomorfina y realización del test de la escalera). Este efecto no siempre alcanza la significación estadística, debido en parte al pequeño tamaño muestral y a la gran variación interindividual.

Es el experimento de evaluación de terapias neurotróficas en primates realizado con mayor tiempo de seguimiento. El estudio de efectividad de distintas terapias neuroprotectoras, complicaciones del sistema de administración, localización óptima de éste, dosis óptimas y efectos secundarios es imprescindible en primates no humanos previo a la administración en pacientes con EP. Requiere constatar de forma evidente un efecto beneficioso exento de complicaciones importantes antes de someter a un paciente a un proceso neuroquirúrgico, aunque para ello sean necesarios protocolos de evaluación tan complejos, extensos y costosos como éste. La interpretación de los resultados ha de hacerse con prudencia. Al evaluar la efectividad de actitudes neurotróficas conviene distinguir

efectos protectores ante la neurotoxicidad de capacidad restauradora frente a la lesión establecida. El modelo empleado debe ser concordante con el mecanismo de actuación postulado para el fármaco en estudio y con el beneficio que se espera obtener. Es de vital importancia para ello los intervalos de tiempo empleados entre la administración del tóxico y la de la droga a evaluar. La restauración de la transmisión dopaminérgica tras largo tiempo de la lesión indica más claramente una actividad trófica que la prevención de la lesión o la restauración en fase aguda, puesto que lo último puede sólo obedecer a interferencia con el mecanismo lesional del tóxico. La acción del FN en esos períodos iniciales puede ser el contrarrestar efectos bioquímicos de neurotoxicidad, pero no indica que pueda ser efectivo en otro modelo o en la EP, donde el déficit ha estado siendo establecido durante años. La distinta severidad del daño producido en el modelo experimental también es un factor importante a tener en cuenta para evaluar un efecto. Para estudiar el efecto sintomático de un fármaco quizás es mejor emplear modelos de lesión severa mientras que para estudio de estrategias neuroprotectoras convienen modelos de lesión parcial, en los que las células remanentes puedan responder a los estímulos tróficos y evidenciarse el efecto deseado.

Pero como ya se ha ido perfilando, el efecto de los FN en los distintos paradigmas experimentales, muchas veces es de complicada interpretación. Muchas veces un efecto puede favorecer el desarrollo de otros: la producción de catecolaminas puede favorecer otros cambios necesarios para la expresión completa de fenotipo dopaminérgico (Du y cols., 1995). No es posible saber si un incremento en el número de neuronas TH es debido a que se ha estimulado la activación del gen o se han favorecido los niveles de proteína a través de otros mecanismos; a un aumento de la expresión de la proteína de modo que se observan células que previamente expresaban niveles no detectables; a neuronas que se han diferenciado a células TH+ a partir de precursores y han comenzado a sintetizar DA o a "nacimiento" de nuevas neuronas. Igualmente, el aumento de unión a 3H-DA puede indicar un incremento en el número de ramificaciones presinápticas que puede ocurrir sin aumentar el número de neuronas.

La evolución sin tratamiento de la enfermedad de Parkinson, así como en el parkinsonismo post MPTP, es muy variable. Conocer qué ocurriría de forma precisa en

nuestros animales sin tratar permitiría extraer de forma más clara conclusiones sobre la eficacia o no de un tratamiento, pero la evolución es distinta en diferentes ejemplares y también diferente según analicemos parámetros clínicos, radiológicos o bioquímicos. A manera de ejemplo, dos ejemplares (iniciales Q y N) recuperaron niveles de HVA casi hasta un nivel normal antes de iniciarse la infusión, pero no mejoraron desde el punto de vista motor. Un ejemplar control (inicial F) mostró una tendencia leve a la recuperación espontánea, tanto clínica como en niveles de HVA, pero en niveles muy inferiores a lo que ocurrió en los animales que respondieron favorablemente a la administración de FGF. En los dos animales control disminuyó la captación estriatal de F-DOPA en el segundo PET lo que indicaría una progresión de la degeneración que quizá no se traduzca clínicamente por la instauración de mecanismos compensadores que podrían ser insuficientes en caso de tiempos más prolongados. Los valores de captación empeoraron en humanos expuestos al MPTP en un 2.3% por año, una progresión similar a la observada en la EP (Vingerhoets y cols., 1994). También empeoró en dos animales tratados con FGF y en tres con GDNF. En estudios previos se constató una disminución de la captación en monos asintomáticos tras la exposición al MPTP (Guttman y cols., 1988), pero también una no progresión de la disminución en la captación a los 11 meses del insulto tóxico. En el ejemplar de inicial L, pese a la severa disminución en la captación, no se desarrolló casi clínica. A los seis meses de una doble lesión con MPTP únicamente era evidente leve temblor y la captación había continuado su disminución. Quizás en este ejemplar habría sido necesario un tiempo mayor de seguimiento para ver si el deterioro radiológico progresivo también se asociaba a un cuadro clínico evidente. Así pues, es difícil establecer conclusiones sobre la estabilidad o no del cuadro basándose sólo en la evolución de dos animales control. Previamente se han descrito en primates lesionados con MPTP tanto cuadros de recuperación espontánea (Jenner y cols., 1986; Luquin y cols., 1991) como de deterioro progresivo, dificultando así la interpretación de las variaciones ocurridas en los animales tratados (Jenner y cols., 1986; Luquin y cols., 1991). Experimentos previamente realizados por nuestro grupo mostraban un deterioro clínico y en la captación de F-DOPA en tres animales infundidos con salino y en uno con EGF (de Yébenes y cols., 1998). En el actual, un animal tratado con GDNF (inicial P) mostró un deterioro clínico progresivo aunque no asociado a empeoramiento en

la captación en el PET . Es difícil poder establecer si el empeoramiento progresivo sea debido a un efecto tóxico del MPTP perpetuado a largo plazo o a un efecto deletéreo del tratamiento con GDNF.

Lesiones estriatales en modelos experimentales producen rotación ipsilateral o contralateral en función de una distinta localización, por lo que el implante del catéter estriatal puede condicionar un cambio en la tasa de rotación no atribuible al tratamiento. Esto hace dudar de la fiabilidad de la tasa de rotación en animales sometidos a una manipulación estriatal como elemento de evaluación del grado de severidad y de la recuperación funcional de las lesiones nigroestriatales y puede explicar la tendencia a disminuir el número de rotaciones en los animales control. Por otro lado, podría especularse que sólo el hecho de introducir un catéter en estriado pudiera mejorar los signos parkinsonianos basándose en el efecto ya conocido de las lesiones a nivel palidal que están incluso ya siendo empleadas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en humanos. De hecho, un ejemplar (inicial C) mejoró de forma transitoria durante la cirugía y tras el sacrificio se observaron lesiones secundarias a hemorragia en el globus pálido. No fueron observados cambios significativos en el período inmediato postcirugía, pero igualmente para obviar este posible sesgo se desecharon para el análisis las escalas neurológicas de las cuatro semanas siguientes a la intervención.

Pese a las dificultades anteriormente mencionadas, la comparación entre grupos de tratamiento demuestra un efecto beneficioso del FGF, no sólo de manera inmediata sino mantenida a los seis meses. Los animales mejoraron tanto en los signos clínicos como en rotación inducida por apomorfina, en la realización del test de la escalera y en la captación estriatal de F-DOPA. Los datos son más concluyentes en caso de eliminar en los análisis al ejemplar de inicial K en el que se observó posteriormente la errónea localización de la punta del catéter. Aunque en otros tres ejemplares se encontró un leve exceso en profundización, el tracto atravesaba el putamen por lo que mediante reflujo el factor pudo llegar a su diana. El grupo posteriormente tratado con FGF tenía incluso un cuadro inicial más severo que el resto de animales por lo que, teóricamente, en caso de repetirse el experimento en ejemplares con menor degeneración inicial, los efectos podrían ser más

evidentes. Puede ser, por el contrario, que una mayor lesión inicial condicione que sea más fácilmente cuantificable una mejoría que apreciaciones sutiles en un modelo tan complejo. Pero más que una mejoría sintomática global y mantenida aproximadamente de un 30% en todos los parámetros clínicos, lo que el tratamiento con FGF puede ofertar es un cambio en la evolución del trastorno. En animales tratados con FGF se observa una recuperación en los índices de captación de F-DOPA, mientras que en animales control y tratados con GDNF un empeoramiento progresivo que orienta a que a tiempos más prolongados, la diferencia se vería incrementada. Por ello se ha prolongado el tiempo previamente planteado de tratamiento en un ejemplar, encontrándose aún una mejoría mayor y se ha realizado un tercer F-DOPA PET, cuyos resultados aun no están disponibles. Previamente nuestro grupo había también obtenido efectos favorables con la infusión estriatal de FGF durante 6 meses en dos primates hemiparkinsonizados. Se obtuvo una mejoría clínica significativa y un incremento mayor del 400% en la captación de F-DOPA en el estriado lesionado, aunque no acompañado de un aumento en el número de neuronas TH+ en nigra respecto a controles. Sólo otro grupo ha trabajado en primates con FGF y, aunque los efectos no fueron satisfactorios y se apreció hidrocefalia por crecimiento de los plexos coroideos, las dosis no eran equiparables y la vía de administración fue intraventricular (Pearce y cols., 1996). En el presente experimento no hay datos clínicos, radiológicos ni morfológicos que hagan pensar en un efecto a distancia del lugar de liberación del factor como, por ejemplo, en el estriado contralateral. En el análisis histológico se descarta que el efecto en la captación de F-DOPA del FGF se deba a neoformación de vasos. El efecto beneficioso es también morfológico, encontrando mayor número medio de neuronas inmunorreactivas a la TH+ en la sustancia nigra lesionada que en los animales tratados con GDNF.

En el grupo tratado con GDNF no se apreció eficacia e incluso se produjo empeoramiento tanto en la exploración clínica como en la tasa de rotación y en la captación de F-DOPA. Los animales empeoraron particularmente en motilidad global y en temblor que, incluso era más evidente en los primeros días post-infusión. Sorprendentemente, el factor trófico dopaminérgico más potente previamente descrito no es eficaz en nuestro paradigma experimental. En investigaciones previas en primates hemiparkinsonianos el

GDNF había sido efectivo y produjo mejora clínica que se mantenía hasta 60 días después de haber suspendido el tratamiento. Pero la vía de administración era intraventricular o en nigra (Gash y cols., 1995; Gash y cols., 1996; Zhang y cols., 1997). En un único experimento había sido administrado en caudado (Gash y cols., 1996). En los estudios previos tampoco se observó efectividad en el temblor. Teóricamente, la liberación en putamen, zona diana de la vía nigroestriatal, debería ser más efectiva y producir menos efectos secundarios que una liberación que permita la dispersión por todo el sistema ventricular. Por ejemplo, la pérdida de peso, efecto secundario ya descrito del GDNF (Gash y cols., 1996; Zhang y cols., 1997; Miyoshi y cols., 1997) por inhibición del apetito, se ha atribuido al acúmulo del GDNF en zonas hipotalámicas, efecto que se tendría que ver minimizado por una liberación intraparenquimatosa en putamen. Pero en nuestro experimento, los animales tratados con GDNF también comían menos e incrementaron su peso menos que el resto. La dosis empleada (1000 µg) había sido eficaz liberada en ventrículo lateral. En los estudios previamente publicados, en los que se apreciaba la mejoría, los períodos de observación clínica abarcaban un período máximo de 4 meses pero no hay precedentes de períodos de tratamiento tan prolongados como en este experimento. En los estudios previos, el GDNF provocó recuperación a nivel patológico y bioquímico en sustancia nigra pero, pese a apreciarse la mejoría conductual, sorprendía que no asociaran una mejoría de parámetros bioquímicos en putamen, lo que dificultaba el conocer a qué atribuir la recuperación clínica (Gerhardt y cols., 1999). Nuestros resultados negativos concuerdan con el nulo efecto evidenciado en humanos en los que, tras administración intraventricular, no se objetivaron efectos beneficiosos. En un paciente que recibió GDNF intraventricular durante un año no se produjo mejoría en la clínica parkinsoniana y sí pérdida de peso, episodios de mareo, signo de L'Hermitte, alucinaciones, depresión y alteraciones de la conducta sin encontrarse tras el fallecimiento evidencias anatomopatológicas de regeneración nigroestriatal (Kordower y cols., 1999).

En nuestro experimento la captación de F-DOPA en el PET no se correlaciona perfectamente con la severidad clínica. Nuestro grupo, en experimentos previos, sí encontró correlación entre la captación de F-DOPA estriatal y el número de neuronas TH en nigra. La disminución de la captación estriatal en algunos estudios previos mostraba correlación con

la incapacidad motora en la enfermedad de Parkinson (Leenders y cols., 1986; Leenders y Palmer, 1986; Brooks y cols., 1990; Brucke y cols., 1995) aunque otros no encontraron correlación positiva con el declinar en ítems motores de la UPDRS (Morrish y cols., 1996). Previamente también en estudios en monos se obtuvo correlación positiva con el tamaño y número de neuronas dopaminérgicas, los niveles de DA y catecolaminas totales estriatales y los niveles de enzimas de su síntesis (Pate y cols., 1993). Puede que la variabilidad tan importante en la severidad del déficit clínico, morfológico y neuroquímico condicione esta falta de correlación. También la gran disminución inicial de la captación puede hacer que un efecto suelo impida una correcta valoración de los datos y que únicamente se observe una relación en experimentos en los que la hipocaptación inicial no es tan severa.

Como dato también importante del presente trabajo destaca la descripción de las neuronas inmunorreactivas a TH en el estriado. Estas células han sido poco estudiadas previamente (Dubach y cols., 1987; Betabet y cols., 1997). Son una población neuronal infrecuente dentro del estriado. Suelen ser neuronas bipolares, pequeñas, no espinosas, de morfología semejante a las gabaérgicas y también contienen glutamato decarboxilasa. Se han encontrado en monos sanos y en monos lesionados por MPTP, administrado tanto intracarotídeo como intramuscular, se ha descrito un incremento bilateral en el número de estas neuronas (x3.5) y en el tamaño de su arborización dendrítica (Bertabet y cols., 1997). No se han encontrado estudios publicados en animales tratados con factores tróficos ni relación con el grado de severidad clínica de la lesión. Nuestros datos, al no disponer de un animal sano con el que comparar, no permiten conocer si el MPTP induce la expresión de fenotipo dopaminérgico en estriado, pero sí muestran que la infusión de los factores administrados en estriado incrementa la presencia de dichas neuronas y que también son más frecuentes en animales con clínica más severa. Son quizá expresión de un intento de compensación de la pérdida de inervación dopaminérgica. También es el primer estudio en que se describe una asociación entre un incremento contralateral al lado lesionado en el número de dichas células y los episodios de rotación contralateral espontánea.

B.3. Complicaciones del procedimiento

Nuestro grupo ha trabajado en modelos enfocados a realizar una liberación estriatal del factor ya que es un lugar accesible desde el punto de vista neuroquirúrgico. La administración intranigral no es aún factible en humanos y la intraventricular, al permitir

una distribución más extensa de factores con acciones no específicas para una determinada línea celular, puede conllevar una mayor incidencia de efectos secundarios.

No son extrapolables todos los efectos secundarios acontecidos en este experimento al hipotético caso de aplicarse este tratamiento en humanos. En los pacientes con EP no se produciría la dificultad inicial en la localización estriatal debida a la distinta forma y dimensiones de los cráneos y a la falta de un instrumental específico. El volumen de la diana anatómica es mucho mayor y hay equipos de neurocirugía con amplia experiencia y procedimientos estandarizados de localización. El catéter podría ser emplazado con la ayuda de los marcos estereotáxicos de material que permite la realización de resonancia magnética o mediante el microregistro neurofisiológico intraoperatorio empleado en la cirugía funcional de la enfermedad de Parkinson. También los efectos tróficos cutáneos probablemente no ocurrieran, debido a la mayor facilidad para mantener condiciones asépticas en la zona y poder aplicar terapias tópicas. Los animales sentían el cuerpo extraño y continuamente tendían a tocar la zona e intentar extraerse el sistema. Apareció clínica sugerente de hipertensión intracraneal transitoria tras el 5% de los procedimientos de infusión. Ocurrieron únicamente en el ejemplar con el catéter mal emplazado (inicial K) y en el que lo rodeaba tejido gliótico (inicial G). Ese problema no apareció en los seis últimos animales donde se mejoró la implantación del catéter. Además sería menos probable en humanos, donde los volúmenes de infusión relativos al tamaño cerebral serían menores. FGF es un potente mitógeno para una gran variedad de células derivadas del mesodermo y neuroectodermo incluyendo fibroblastos, células endoteliales vasculares y corneales, mioblastos, condrocitos, osteoblastos y células gliales. Por ello, uno de los efectos secundarios temidos y no encontrados era la proliferación de estirpes celulares no deseadas.

Como ha sido ya mencionado, el GDNF induce en los animales de experimentación pérdida de peso. Nuestro experimento tiene una duración mucho mayor que los que referían que únicamente se producía una pérdida inicial y evidencia que, aunque no de manera significativa, esos animales tenían un incremento de peso a largo plazo menor a los dos grupos de tratamiento.

Con todas las apreciaciones previas y, pese a las diferencias existentes entre el modelo animal y la enfermedad de Parkinson, pueden establecerse ya planteamientos sobre

la realización de un ensayo en humanos con mejores expectativas de efectividad incluso que en nuestro experimento, ya que en fases menos avanzadas y agudas de degeneración podrían establecerse más fácilmente mecanismos restauradores y ser beneficioso un tratamiento neurotrófico con escasos efectos secundarios.

A pesar de todas las limitaciones metodológicas del estudio, inherentes a una muestra pequeña, con gran variabilidad de severidad interindividual y con problemas de localización de la diana terapéutica, la coincidencia de mejoría clínica, en las pruebas conductuales (apomorfina y test de la escalera), bioquímica (niveles de homovanílico en LCR y de captación de F-DOPA en PET) sugiere que la infusión intraestriatal de FGF en pacientes con enfermedad de Parkinson podría ofrecer una nueva terapéutica neurorestauradora.

VI . CONCLUSIONES

- El MCG infundido en estriado ha demostrado en experimentos in vivo en roedores propiedades neuroprotectoras y neurorestauradoras selectivas y potentes en neuronas dopaminérgicas frente a la toxicidad por 6-OHDA. Consigue un incremento de DA y sus metabolitos, mejoría en la tasa de supervivencia y de rotación por apomorfina.
- Se han definido las características clínicas, neuroquímicas y radiológicas de nuestro modelo de hemiparkinsonismo en primates mediante administración intracarotídea de MPTP.
- La infusión intraestriatal de FGF en primates durante un período medio de 6 meses produce una mejoría de los parámetros clínicos, en la rotación inducida por apomorfina, en la realización del test de la escalera, en la captación estriatal de F-DOPA y en el número medio de neuronas TH+ en sustancia nigra. La infusión de GDNF no se demostró eficaz.
- La infusión estriatal de estos factores tróficos asocia escasos efectos secundarios desde el punto de vista clínico y ausencia de complicaciones anatomopatológicas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Acheson AL, Zigmond MJ, Stricker EM. Compensatory increase in tyrosine hydroxylase activity in rat brain after intraventricular injection of 6-hydroxydopamine. *Science* 1980; 207: 537-540.

Acuna-Castroviejo D, Coto Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 1997; 60(2): 23-29.

Adams JD, Johannessen JN, Schuller HM, Bacon JP, Markey SP. The role of oxidative stress in the systemic toxicity of MPTP and MPP+. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y JJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986.

Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat. Med.* 1996; 2(6): 696-699.

Agid Y, Javoy F, Glowinski J. Hyperactivity of the remaining dopaminergic neurons after partial destruction of the nigra-striatal dopaminergic system in the rat. *Nature* 1973; 245: 150-151.

Akaneya Y, Takahashi M, Hatanak H. Involvement of free radicals in MPP+ neurotoxicity against rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci-Lett.* 1995, 193: 53-56.

Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 1990; 5(3): 297-306.

Alexi T, Hefti F. Trophic actions of transforming growth factor alpha on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 1993; 55: 903-910.

Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenov S, Miller J, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman C. Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1992; 89(23): 11347-11351.

Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, Jones BE, Jackson C, Wiegand y cols. Effects of BDNF and NT3 on neurochemical and behavioural deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J. Neurochem.* 1994; 63: 1021-1032.

Andén EN, Dahlström A, Fuxe K, Larsson K, Olson L, Ulfberg U. Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon. *Acta Physiol Scand.* 1966; 46: 313-316.

Andersen J, Fim DM, Isacson W, Beal MF, Breakfield XO. Elevation of neuronal MAO-B activity does not increase sensitivity to the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Brain Res.* 1994; 656: 108-114.

Anderson KD, Alderson RF, Altar CA, DiStefano PS, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. *J. Comp. Neurol.* 1995; 357(2): 296-317.

Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, Ischiropoulos H. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998; 23: 7659-7663.

Araujo DM, Hilt DC, Miller PJ, Wen D, Jiao S, Lapchak PA. Ret receptor tyrosine kinase immunoreactivity is altered in glial cell line-derived neurotrophic factor-responsive neurons following lesions of the nigrostriatal and septohippocampal pathways. *Neuroscience* 1997; 80(1): 9-16.

Arenas E, Persson H. Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo. *Nature* 1994; 27: 368-371.

Asai T, Wanaka A, Kato H, Masana Y, Seo M, Tohyama M. Differential expression of two members of FGF receptor gene FGFR-1 and FGFR-2 mRNA, in the adult rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1993; 17(1-2): 174-178.

Asberg M, Bertilsson L, Martensson B, Scalia-Tomba GP, Thoren P, Trankman-Bendz L. CSF monoamine metabolites in melancholia. *Acta Psychiatr. Scand.* 1984; 69: 201-219.

Ashizawa T, Patten BM, Jankovic J. Meige's syndrome. *South Med. J.* 1980; 73(7): 863-866.

Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Seven cases. *Neurology* 1985; 35: 949-956.

Bankiewicz K, Oldfield EH, Chiueh CC, Doppmann JL, Jacobowitz DM, Kopin IJ. Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-1,4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Scien.* 1986; 39: 7-16.

Bankiewicz K, Mandel RJ, Sofroniew MV. Trophism, transplantation and animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 1993; 124: 140-149.

Barker R, Dunnet SB. Ibotenic acid lesions of the striatum reduce drug-induced rotation in the 6-hydroxy dopamine-lesioned rat. *Exp. Brain. Res.* 1994; 10: 365-374.

Batchelor PE , Liberatore GT, Wong JYF ,Porritt MJ, GA Donnan and DW Howells. Mechanical striatal injury is associated with increased expression of both BDNF and GDNF by microglia and macrophages. *Mov. Disord.* 1998; 13(suppl2): P3.223.

Baumann RJ, Jameson HD, McKean HE, Haack DG, Weisberg LM. Cigarette smoking and Parkinson disease: 1.Comparison of cases with matched neighbors. *Neurology* 1980; 30(8): 839-843.

Baumbarten HG, Zimmermann B. Neurotoxic phenylalkylamines and indolealkylamines. En: *Selective neurotoxicity*. H. Herken y F. Hucho editores. Springer verlag, Berlin, Heilderberg, 1992. Pag 225-291.

Beal MF. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 1995; 38: 357-366.

Beal MF, Matthews RT, Tieleman A, Shults CW. Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res* 1998; 783(1): 109-114.

Bean AJ, Elde R, Cao Y y cols. Expression of acidic and basic fibroblast growth factors in the sustantia nigra of rat, monkey and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 10237-10241.

Beck KD, Knusel B, Hefti F. The nature of trophic action of brain derived neurotrophic factor, des (1-3)-insulin-like growth factor-1 and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 1993; 52: 855-866.

Beck KD. Functions of brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Progress Neurobiol.* 1994; 44: 497-516.

Beck KD, Valverde J, Alexi T y cols. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy induced degeneration in the adult brain. *Nature* 1995; 373: 339-341.

Beck KD, Irwin I, Valverde J, Brennan TJ, Langston JW, Hefti F. GDNF induces a dystonia-like state in neonatal rats and stimulates dopamine and serotonin synthesis. *Neuron* 1996; 16(3): 665-673.

Belluardo N, Wu G, Mudo G, Hansson AC, Pettersson R, Fuxe K. Comparative localization of fibroblast growth factor receptor-1, -2, and -3 mRNAs in the rat brain: in situ hybridization analysis. *J. Comp. Neurol.* 1997; 379(2): 226-246.

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 1973; 20(4): 415-455.

Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT. Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J. Neurosci.* 1997; 17(17): 6761-6768.

Birkmayer W, Knoll J, Riederer P, Youdim MBH, Hars V, Marton J. Increased life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar treatment in Parkinson's disease: A long-term study. *J. Neural. Transm.* 1985; 64: 113-127.

Bjorklund A, Lindvall O. Dopamine containing systems in the CNS. En: Bjorklund A y Kökfelt T eds. *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 2, parte 1: Classical neurotransmitters in the CNS. Elsevier, Amsterdam, 1984.

Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 1997; 4(3-4): 186-200.

Blake CI, Spitz E, Leehey M, Hoffer BJ, Boyson SJ. Platelet mitochondrial respiratory chain function in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1997; 12: 3-8.

Blanchet PJ, Konitsiotis S, Hyland K, Arnold LA, Pettigrew KD, Chase TN. Chronic exposure to MPTP as a primate model of progressive parkinsonism: a pilot study with a free radical scavenger. *Exp. Neurol.* 1998; 153: 214-222.

Blunt SB, Jenner P, Marsden CD. Suppressive effect of L-DOPA on dopamine cells remaining in the ventral tegmental area of rats previously exposed to the neurotoxin 6-hydroxydopamine. *Mov Disord* 1993; 8: 129-133.

Borlongan CV, Freeman TB, Hausder RA, Cahill DW, Sanberg PR. Cyclosporine-A increases locomotor activity in rats with 6-OHDA-induced hemiparkinsonism: relevance to neural transplantation. *Surg. Neurol.* 1996; 46: 384-388.

Bowenkamp KE, Hoffman AF, Gerhardt GA. Glial cell line derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 1995; 355: 479-489.

Bowenkamp KE, Lapchak PA, Hoffer BJ, Miller PJ, Bickford PC. Intracerebroventricular glial cell line-derived neurotrophic factor improves motor function and supports nigrostriatal dopamine neurons in bilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Exp. Neurol.* 1997; 145(1): 104-117.

Boyce S, Clarke CE, Luquin R, Peggs D, Robertson RG, Mitchell IJ, Sambrook MA, Crossman AR. Induction of chorea and dystonia in parkinsonian primates. *Mov. Disord.* 1990; 5(1): 3-7.

Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Jenner P, Kelly ME, Marsden CD, Naylor RJ. 1-Methyl-1,4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. *Nature* 1986; 319: 56-57.

Brooks DJ, Ibanez V, Sawle GV, Quinn N, Lees AJ y cols. Differing patterns of striatal 18F-dopa uptake in Parkinson's disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Ann. Neurol.* 1990; 28: 547-555.

Brooks DJ. Detection of preclinical Parkinson's disease with PET. *Neurology* 1991; 41(Suppl 2): 24-28L.

Brooks DJ. PET studies on the early and differential diagnosis of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1992; 7(Suppl1):186.

Brooks DJ, Ibanez V, Sawle GV, Playford ED, Quinn N y cols. Striatal D2 receptor status in patients with Parkinson's disease, striatonigral degeneration, and progressive supranuclear palsy, measured with 11C-raclopride and positron emission tomography. *Ann. Neurol.* 1992; 31: 184-192.

Brooks BA, Eidelberg E, Morgan WW. Behavioral and biochemical studies in monkeys made hemiparkinsonian by MPTP. *Brain Res.* 1993; 419: 329-332.

Brucke T, Wober C, Podreka I, Wober-Bingol C, Asenbaum S, Aull S, Wenger S, Ilieva D, Harasko-van der Meer C, Wessely P, y cols. D2 receptor blockade by flunarizine and cinnarizine explains extrapyramidal side effects. A SPECT study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995; 15(3): 513-518.

Buj-Bello A, Adu J, Pinon LG, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, Chinchetru M, Buchman VL, Davies AM. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1997; 387(6634): 721-724.

Burn DJ, Rinne JO, Quinn NP, Lees AJ, Marsden CD, Brooks DJ. Striatal opioid receptor binding in Parkinson's disease, striatonigral degeneration and Steele-Richardson-Olszewski syndrome: a [11C] diprenorphine PET study. *Brain* 1995; 118: 951-958.

Burns RS, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983; 80: 4546-4550.

Burns RS, Phillips JM, Chiueh CC, Parisi JE. The MPTP-treated monkey model of Parkinson's disease. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, e IJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986.

Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intraestriatal injection of 6- hydroxydopamine in rats: behavioural and biochemical evidence. *Brain Res.* 1991; 476: 10-15.

Calne DB, Langston JW, Martin MRW. Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. *Nature* 1985; 317: 246-248.

Calne DB, de la Fuente-Fernandez R, Kishore A. Contributions of positron emission tomography to elucidating the pathogenesis of idiopathic parkinsonism and dopa responsive dystonia. *J. Neural. Transm. Suppl.* 1997; 50: 47-52.

Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 1998; 20(5): 869-882.

Campbell KJ, Takada M, Hattori T. Evidence for retrograde axonal transport of MPP⁺ in the rat. *Neurosci. Lett.* 1990; 118: 151-154.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxy tryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 1957; 180: 1200.

Carlsson A, Lindqvist M. Metatyrosine as a tool for selective protection of catecholamine stores against reserpine. *Eur. J. Pharmacol.* 1967; 2: 187-192.

Carrillo MC, Kanai S, Nokubo N. Deprenyl induces activities of both superoxidodismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci.* 1991; 48: 517-521.

Cass WA. GDNF selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of methamphetamine. *J. Neurosci.* 1996; 16(24): 8132-8139.

Cintra A, Cao Y, Oellig C y cols. Basic FGF is present in dopaminergic neurons of the ventral midbrain of the rat. *NeuroReport* 1991; 2: 597-600.

Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AHV. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J. Neurochem.* 1992; 58: 786-789.

Cohen G. Oxygen radicals and Parkinson's disease. *Upjohn Symposium: Oxygen radicals*, 1987.

Cooper MJ, Hutchins GM, Cohen PS, Helman LJ, Israel MA. Neuroblastoma cell lines mimic chromaffin neuroblast maturation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1991; 366: 343-350.

Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer L. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. E. J. Med.* 1967; 276: 374-379.

Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of parkinsonism: Chronic treatment with L-DOPA. *N. Eng. J. Med.* 1969; 280: 337-345.

Creese Y, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioural supersensitivity. *Science* 1977; 197: 596-598.

Creese Y. Dopamine receptors explained. *Trends Neurosci* 1982; 5: 40-43.

Cunningham LA, Hansen JT, Short MP, Bohn MC. The use of genetically altered astrocytes to provide nerve growth factor to adrenal chromaffin cells grafted into the striatum. *Brain Res.* 1991; 561(2): 192-202.

Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston WJ, Di Monte D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* 1991; 57: 348-351.

Chen XL, Roisen FJ, Gupta M. The effect of prior in vitro exposure of donor cells to trophic factors in neurotransplantation. *Exp. Neurol.* 1996; 138: 64-72.

Chiba K, Trevor A, Castagnoli N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine MPTP by brain monoaminoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 120: 574-578.

Chiueh CC, Burns RS, Kopin IJ, Kirk KL, Firnau G, Nahmias C y cols. 6-18F-DOPA/ Positron tomography visualized degree of damage to brain dopamine in basal ganglia of monkeys with MPTP-induced parkinsonism. En: *MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome.* SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y IJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986. Pág. 327-338.

Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannnesen JN, Jacobowitz DM, Kopin IJ. Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenil-1,2,3,6-tetrahidropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 1984; 20: 548-553.

Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 1997; 275(5301): 838-841.

D'Amato RJ, Benham DF, Snyder SH. Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to neuromelanin. *J. Neurochem.* 1987; 48: 653-658.

Damier P, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Zhang P, Agid Y. Protective role of glutathione peroxidase against neuronal death in Parkinson's disease. *Neuroscience* 1993; 52: 1-6.

Damier P, Kastner A, Agid Y, Hirsch EC. Does monoamine oxidase type B play a role in dopaminergic nerve cells death in Parkinson's disease? *Neurology* 1996; 46:1262-1269.

Date I, Notter MFD, Felten SY, y cols. MPTP-treated young mice but not aging mice show partial recovery of the nigrostriatal dopaminergic system by stereotaxic injection of acidic fibroblast growth factor (aFGF). *Brain Res.* 1990; 526: 156-160.

Davies AM. Neurotrophin switching: where does it stand? *Curr Opinion Neurobiology* 1997; 7: 110-118.

Davies GC, Williams AC, Markey SP Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979; 1: 249-254.

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in the brain: the free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.* 1992; 32: 297-311.

De Long MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neuroscience* 1990; 13: 281-285.

Del Zompo M, Piccardi MP, Ruiu S, Albanese A, Morelli M.
Localization of MPP+ binding sites in the brain of various mammalian species.
J. Neural. Transm. (P-D sect) 1992; 4:181-190.

Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from
hydrogen peroxide toxicity. J. Neurosci. 1996; 16(8): 2553-2562.

De Rijk MC, Zourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, López
Pousa S y cols. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe:
the Europarkinson Collaborative Study. European Community Concerted
Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. J. Neurol. Neurosurg.
Psychiatry 1997; 62: 296-299.

De Yébenes JG, Sánchez Pernaute R, Garrido JM, Rábano A, Albisua J,
Vontobel P, Al- Assir I, Rojo A, M.A. Mena, García Ruíz P, Jorge P, Correa C,
Leenders KL, Antonini A, Gunther I, Psylla M. Long-term intracerebral
infusion of fibroblast growth factors restores motility and enhances F-DOPA
uptake in parkinsonian monkeys. Parkinsonism and Related Disorders 1998;
4: 147-158.

Di Monte D, Smith MT. Free radicals, lipid peroxidation and 1-methyl 4-
phenyl 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. Rev.
Neurosci. 1988; 2: 596-598.

Di Monte DA, Wu EY, Langston JW. Role of astrocytes in MPTP
metabolism and toxicity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1992; 648: 219-228.

Di Monte DA, Schipper HM, Hetts S, Langston JW. Iron-mediated
bioactivation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in glial
cultures. Glia 1995; 15: 203-206.

Doudet DJ, Wyatt RJ, Cannon-Spoor E, Suddath R, McLellan CA,
Cohen RM. 6-[18F]fluoro-L-dopa and cerebral blood flow in unilaterally
MPTP-treated monkeys. J. Neural Transplant. Plast. 1993; 4(1): 27-38.

Du X, Stull ND, Iacovitti L. Brain-derived neurotrophic factor works coordinately with partner molecules to initiate tyrosine hydroxylase expression in striatal neurons. *Brain Res.* 1995; 680(1-2): 229-233.

Du X, Iacovitti L. Multiple signaling pathways direct the initiation of tyrosine hydroxylase gene expression in cultured brain neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997; 50(1-2): 1-8.

Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden DM, Martin R, German DC. Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. *Neurosci. Lett.* 1987; 75 :205-210.

Dunigan CD, Shamoo AE. Identification of the major transport pathway for the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience* 1996; 75: 37-41.

Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int.* 1997; 30(4-5): 347-374.

Ebendal T, Tomac A, Hoffer BJ, Olson L. Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia. *J. Neurosci. Res.* 1995; 40(2): 276-284.

Eberling JL, Bankiewicz KS, Jordan S, VanBrocklin HF, Jagust WJ. PET studies of functional compensation in a primate model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 1997; 8(12): 2727-2733.

Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von noradrenalin und dopamin im gehirn des menschen und ihr verhalten bei eskrankungen des extrapyramidalen systems. *Wien Klin Wschr* 1960; 72:1236.

Eidelberg D, Moeller JR, Dhawan V, Sidtis JJ, Ginos JZ, Strother SC, Cedarbaum J, Greene P, Fahn S, Rottenberg DA. The metabolic anatomy of Parkinson's disease: complementary [18F]fluorodeoxyglucose and [18F]fluorodopa positron emission tomographic studies. *Mov. Disord.* 1990; 5(3): 203-213.

Engel J, Bohn MC. The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J. Neurosci.* 1991; 11(10): 3070-3078.

Engel J, Schubert D, Bohn MC. Conditioned media derived from glial cell lines promote survival and differentiation of dopaminergic neurons in vitro: role of mesencephalic glia. *J. Neurosci. Res.* 1991; 30: 359-371.

Engel J. Spatial and temporal growth factor influences on developing midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 1998; 53(4): 405-414.

Falardeau, Bedard PJ, Boucher R, Di Paolo T. Relation between brain dopamine loss and D2-mediated receptor density in MPTP-treated monkeys. *Neurosci. Lett.* 1988; 86: 225-229.

Farkas LM, Suter-Crazzolara C, Unsicker K. GDNF induces the calretinin phenotype in cultures of embryonic striatal neurons. *J. Neurosci. Res.* 1997a; 50(3): 361-372.

Farkas LM, Suter-Crazzolara C, Unsicker K. GFR α -2 and GFR α -3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J. Biol. Chem.* 1997b; 272(52): 33111-33117.

Ferrari G, Minozzi MC, Toffano G y cols. Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Dev. Biol.* 1989; 133: 140-147.

Ferhat L, Represa A, Zouaoui-Aggoun D, Ferhat W, Ben-Ari Y, Khrestchatisky. MFGF-2 induces nerve growth factor expression in cultured rat hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 1997; 9(6): 1282-1289.

Fisher LJ, Jinnah HA, Kale LC, Higgins GA, Gage FH. Survival and function of intrastrially grafted primary fibroblasts genetically modified to produce L-dopa. *Neuron* 1991; 6(3): 371-380.

Fornai F, Alessandri MG, Fascetti F, Vaglini F, Corsini GU. Clonidine suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced reductions of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase activity in mice. *J. Neurochem.* 1995; 65(2): 704-709.

Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte GA. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 1986; 20: 449-455.

Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I. An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain Res.* 1988; 448: 150-157.

Freese A, Stern M, Kaplitt MG, O'Connor WM, Abbey MV, O'Connor MJ, During MJ. Prospects for gene therapy in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1996; 11(5): 469-488.

Friden PM, Walus LR, Watson P, Doctrow SR, Kozarich JW, Backman C, Bergman H, Hoffer B, Bloom F, Granholm AC. Blood-brain barrier penetration and in vivo activity of an NGF conjugate. *Science* 1993; 259 (5093): 373-377.

Friedman WJ, Ernfors P, Persson H. Transient and persistent expression of NT-3/HDNF mRNA in the rat brain during postnatal development. *J. Neurosci.* 1991; 11(6): 577-584.

Frim DM, Uhler TA, Galpern WR, y cols. Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain derived neurotrophic factors prevent 1-methyl-4-phenyl pyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 5104-5108.

Fukuda T, Watabe K, Tanaka J. Effects of bromocriptine and/or L-DOPA on neurons in substantia nigra of MPTP-treated C57BL/6 mice. *Brain Res.* 1996; 728: 274-276.

Fujiyama F, Masuko S. Association of dopaminergic terminals and neurons releasing nitric oxide in the rat striatum: an electron microscopic study using NADPH-diaphorase histochemistry and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res. Bull.* 1996; 40(2): 121-127.

Gall C, Lauterborn J. The dentate gyrus: a model system for studies of neurotrophin regulation. *Epilepsy Res. Suppl.* 1992; 7: 171-185.

Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp. Neurol.* 1996; 140(1): 1-13.

Garnett ES, Nahmias C, Firnau G. Central dopaminergic pathways in hemiparkinsonism examined by positron emission tomography. *Can. J. Neurol. Sci.* 1984; 11: 174.

Garvey J, Petersen M, Waters C, Rose SP, Hunt S, Briggs R, y cols. Administration of MPTP to common marmoset does not alter cortical cholinergic function. *Mov. Disord.* 1998; 1: 129-134.

Gash DM, Zhang Z, Cass WA, Ovadia A, Simmerman L, Martin D, Russell D, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA Morphological and functional effects of intranigally administered GDNF in normal rhesus monkeys. *J. Comp. Neurol.* 1995; 363(3): 345-358.

Gash DM, Zhang Z, Ovidia A, y cols. "Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF". *Nature* 1996; 380: 252-255.

Gash DM, Zhang Z, Gerhardt G. Neuroprotective and neurorestaurative properties of GDNF. *Ann. Neurol.* 1998; 44(Suppl 1): S 121-S125.

.Gasser T, Muller Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat. Genet.* 1998; 18: 262-514.

Gerhardt GA, Cass WA, Huettl P, Brock S, Zhang Z, Gash DM. GDNF improves dopamine function in the susbstatia nigra but not the putamen of unilateral MPTP-lesioned rhesus monkeys. *Brain Res.* 1999; 817:163-171.

Germain D, Manaye K, Smith W y col. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann. Neurol.* 1989; 26: 507-514.

German DC, Nelson EL, Liang CL, Speciale SG, Sinton CM, Sonsalla PK. The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* 1996; 5(4): 299-312.

Gibb WRG, Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ. The histological effects of intracerebral injection or infusion of MTPT (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) in rat and mouse. *Brain Research* 1988; 461: 361-366.

Giovanni A, Sonsalla PK, Heikkila E. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2:Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 270: 1008-1014.

Glinka Y, Youdim MHB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 295:329-332.

Glowacka D, Wagner JA. Role of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in regulating the morphological differentiation of PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 1990; 25(4): 453-462.

Grahnam DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 1978; 14: 633-643.

Granholm AC, Mott JL, Bowenkamp K, Eken S, Henry S, Hoffer BJ, Lapchak PA, Palmer MR, van Horne C, Gerhardt GA. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. *Exp. Brain Res.* 1997; 116(1): 29-38.

Grondin R, Gash DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 1998; 245 (Suppl 3): 35-42.

Grote C, Meisinger C. The multifunctionality of FGF-2 in the adrenal medulla. *Anat. Embryol. (Berl)* 1997; 195(2): 103-111.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* 1997; 111: 219-223.

Gunning PW, Letourneau PC, Landreth GE, Shooter EM. The action of nerve growth factor and dibutyl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate on rat pheochromocytoma reveals distinct stages in the mechanisms underlying neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 1981; 1(10):1085-1095.

Guttman M, Yong VW, Kim SU, Calne DB, Martin WR, Adam MJ, Ruth TJ. Asymptomatic striatal dopamine depletion: PET scans in unilateral MPTP monkeys. *Synapse* 1988; 2(5): 469-473.

Hadjiconstantinou M, Fitkin JG, Dalia A, Neff NH. Epidermal growth factor enhances striatal dopaminergic parameters in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse. *J. Neurochem.* 1991; 57: 479-482.

Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J. Neurochem.* 1996; 66: 501-505.

Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat. Med.* 1996; 2(9): 965-966.

Haque NS, Hlavin ML, Fawcett JW, Dunnett SB. The neurotrophin NT4/5, but not NT3, enhances the efficacy of nigral grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1996; 712(1): 45-52.

Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 170: 1049-1055.

Hebert MA, Gerhardt GA. Behavioral and neurochemical effects of intranigral administration of glial cell line-derived neurotrophic factor on aged Fischer 344 rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 282(2): 760-768.

Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* 1980; 195: 123-137.

Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 1984; 311: 467-469.

Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas Y, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: Implications for the mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci. Lett.* 1985a; 62: 389-394.

Heikkila RE, Nicklas WJ, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity after the stereotaxic administration of the 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion (MPP+) to rats. *Neurosci. Lett.* 1985b; 59: 135-140.

Heikkila RE, Nicklas WJ, Duvoisin RC. Studies on the mechanisms of MPTP-MPP+ induced neurotoxicity in rodents. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y JJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986.

Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988; 334: 345-348.

Hirsch EC. Biochemistry of Parkinson's disease with special reference to the dopaminergic system. *Mol. Neurobiol.* 1994; 9: 135-142.

Hirsch EC. Glial cells and the inflammatory reaction in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration?. *Mov. Disord.* 1998a; 13(Suppl2): M10.

Hirsch EC, Hunot S, Damer P, Faucheux B. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann. Neurol.* 1998b; 44 (3Suppl 1): S 115-20.

Ho A, Blum M. Regulation of astroglial-derived dopaminergic neurotrophic factors by interleukin-1 beta in the striatum of young and middle-aged mice. *Exp. Neurol.* 1997; 148: 348-359.

Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, y cols. Glial cell line derived neurotrophic factor reverses toxin induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci. Lett.* 1994; 182: 107-111.

Hoffman D, Breakefield XO, Short MP, Aebischer P. Transplantation of a polymer-encapsulated cell line genetically engineered to release NGF. *Exp. Neurol.* 1993; 122(1): 100-106.

Hoffman AF, van Horne CG, Eken S, Hoffer BJ, Gerhardt GA. In vivo microdialysis studies on somatodendritic dopamine release in the rat substantia nigra: effects of unilateral 6-OHDA lesions and GDNF. *Exp. Neurol.* 1997; 147(1): 130-141.

Hornykiewicz O. Dopamine (3 hidroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 1966; 18: 925-964.

Hornykiewicz O, Kish SJ, Becker LE, Farley I, Shannak K. Brain neurotransmitters in dystonia musculorum deformans. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315: 347-353.

Hou JG, Lin LF, Mytilineou C. Glial cell line derived neurotrophic factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic neurons in vitro and promotes their survival and regrowth after damage by 1 methyl 4 phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 1996; 66: 74-82.

Hou JG, Cohen G, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor stimulation of glial cells protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: involvement of the glutathione system. *J. Neurochem.* 1997; 69(1): 76-83.

Hudson JL, van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* 1993; 626:167-174.

Hudson J, Granholm AC, Gerhardt GA, Henry MA, Hoffman A, Biddle P, Leela NS, Mackerlova L, Lile JD, Collins F, y cols. Glial cell line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits in vivo. *Brain Res. Bull.* 1995; 36(5): 425-432.

Hung HC, Tao PL, Lee EH. 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP+) uptake does not explain the differential toxicity of MPP+ in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Neurosci. Lett.* 1995; 196: 93-96.

Hung HC, Lee EH. The mesolimbic dopaminergic pathway is more resistant than the nigrostriatal dopaminergic pathway to MPTP and MPP+ toxicity: role of BDNF gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996; 41: 14-26.

Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM. Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J. Neurosci.* 1994; 14(1): 335-347.

Iacopino AM, Christakos S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 4078-4082.

Isacson PJ. Trophic factor response to neuronal stimuli or injury. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995; 5: 350-357.

Javoy-Agid F, Hirsch EC, Dumas S, Duyckaerts C, Mallet J, Agid Y. Decreased tyrosine hydroxylase messenger RNA in the surviving dopamine neurons of the substantia nigra in Parkinson's disease: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 1990; 38(1): 245-253.

Jasso-López D, Tapia R. Neurotoxic effect of intranigral injection of 1-methyl,4-phenylpyridinium on GABA-containing neurons and its relation to circling behaviour. *J. Neurochem.* 1995; 64: 794-801.

Jellinger K. Overview of the morphological changes in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 1986; 45: 1-18.

Jenner P, Rupniak NM, Rose S, Kelly E, Kilpatrick G, Lees A, Marsden CD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci. Lett.* 1984; 50(1-3): 85-90.

Jenner P, Marsden CD, Costall B, Naylor RJ. MPTP and MPP⁺ induced neurotoxicity in rodents and the common marmoset as experimental model for investigating Parkinson's disease. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y IJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986a.

Jenner P, Rose S, Nomoto M, Marsden CD. MPTP-induced parkinsonism in the common marmoset: behavioural and biochemical effects. *Adv. Neurol.* 1986b; 45: 183-186.

Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AHV, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Ann. Neurol.* 1992; 32: S82-S87.

Jimenez-Jimenez FJ, Mateo D, Gimenez-Roldan S. Premorbid smoking, alcohol consumption, and coffee drinking habits in Parkinson's disease: a case-control study. *Mov. Disord.* 1992; 7(4): 339-344.

Jin BK, Iacovitti L. Dopamine differentiation factors produce partial motor recovery in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurobiol. Dis.* 1995; 2(1): 1-12.

Jing S, Yu Y, Fang M y cols. GDNF induces the calretinin phenotype in cultures of embryonic striatal neurons. *J. Neurosci. Res.* 1997a; 50(3): 361-372.

Jing S, Yu Y, Fang M, Hu Z, Holst PL, Boone T, Delaney J, Schultz H, Zhou R, Fox GM. GFR α -2 and GFR α -3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J. Biol. Chem.* 1997b; 272(52): 33111-33117.

Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Markey SP. Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Scien.* 1985; 36: 219-224.

Jonson G, Sachs Ch. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 1970; 9: 141-145.

Jonson G. Studies on the mechanism of 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *Med. Biol.* 1976; 54: 406-420.

Jordan S, Eberling JL, Bankiewicz KS, Rosenberg D, Coxson PG, VanBrocklin HF, O'Neil JP, Emborg ME, Jagust WJ. 6-[¹⁸F]fluoro-L-m-tyrosine:metabolism, positron emission tomography kinetics, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine lesions in primates. *Brain Res.* 1997; 750(1-2): 264-276.

Kalaria RN, Mitchell MJ, Harik SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 3521-3525.

Kawamata T, Dietrich WD, Schallert T, Gotts JE, Cocke RR, Benowitz LI, Finklestein SP. Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94(15): 8179-8184.

Kearns CM, Cass WA, Smoot K, Kryscio R, Gash DM. GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. *J. Neurosci.* 1997; 17: 7111-7118.

Kilbourn MR, Charalambous A, Frey KA, Sherman P, Higgins DS Jr, Greenamyre JT. Intrastriatal neurotoxin injections reduce in vitro and in vivo binding of radiolabeled rotenoids to mitochondrial complex I. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997; 17: 265-272.

Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Delayed infusion of GDNF can promote functional recovery in spontaneous motor behaviors in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1998; 13: P1.219.

Knoll J. Deprenyl (selegiline): the history of its development and pharmacological action. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 1983; 95: 57-80.

Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K, Hefti F. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88(3): 961-965.

Koller WC. Neuroprotective therapies for Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 1997; 144: 24-28.

Kordower JH, Palfi S, Mufson EJ, Levey AI, Er Yun C, MA S, Cochran EJ y col. Clinico-pathological findings following intraventricular GDNF treatment in a patient with Parkinson's disease. *Neurology* 1999 (supl 2); 52: S02.002.

Kostic V, Donovan D, Yokoyama R, Przedborski S. Transgenic mice with increased number of dopamine transporters (DAT) show greater sensitivity to MPTP. *Mov. Disord.* 1997; 12: 43.

Krobert K, Lopez-Colberg I, Cunningham LA. Astrocytes promote or impair the survival and function of embryonic ventral mesencephalon co-grafts: effects of astrocyte age and expression of recombinant brain-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 1997; 145(2 Pt 1): 511-523.

Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 1998; 18: 106-108.

Kupsch A, Gerlach M, Puppeter SC, Sautter J, Dirr A, Arnold G, Opitz-W, Przuntek H, Riederer P, Oertel WH. Pretreatment with nimodipine prevents MPTP-induced neurotoxicity at the nigral, but not at the striatal level in mice. *Neuroreport* 1995; 6(4): 621-625.

Kupsch A, Sautter J, Schwarz J, Riederer P, Gerlach M, Oertel WH. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in non-human primates is antagonized by pretreatment with nimodipine at the nigral, but not at the striatal level. *Brain Res.* 1996; 741(1-2): 185-196.

Lange KW. Behavioural effects and supersensitivity in the rat following intranigral MPTP and MPP+ administration. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 175: 57-61.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.

Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 1984; 48: 87-92.

Langston JW, Irwin I, Langston EB, DeLanney LE, Ricaurte GA. MPTP induces parkinsonism in humans: A review of the syndrome and observations relating to the phenomenon of tardive toxicity. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y JJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986.

Lapchak P, Jiao S, Miller P y cols. Biology of GDNF: implications for the use of GDNF to treat Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 1996; 5: 197-205.

Lapchak P, Jiao S, Miller P y cols. Pharmacological characterization of GDNF: implications for GDNF as a therapeutic molecule for treating neurodegenerative diseases. *Cell Tissue Res.* 1996; 286: 179-189.

Lapchak PA, Miller PJ, Collins F, Jiao S. Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates behavioural deficits and regulates nigrostriatal dopaminergic and peptidergic markers in 6-hydroxydopamine-lesioned adult rats: comparison of intraventricular and intranigral delivery. *Neuroscience* 1997a; 78(1): 61-72.

Lapchak PA, Palmer MR, van Horne C, Gerhardt GA. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6- hydroxydopamine lesioned striatum. *Exp. Brain Res.* 1997b; 116(1): 29-38.

Lapchak PA, Gash DM, Jiao S, Miller PJ, Hilt D. Glial cell line-derived neurotrophic factor: a novel therapeutic approach to treat motor dysfunction in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 1997; 144(1): 29-34.

Lapchak PA, Jiao S, Collins F, Miller PJ. Glial cell line-derived neurotrophic factor: distribution and pharmacology in the rat following a bolus intraventricular injection. *Brain Res.* 1997; 747(1): 92-102.

Leenders K, Palmer A. DOPA uptake and dopamine receptor binding in the human brain in vivo. En Fahn S, Marsden CD, Van Woert MH (eds): *Recent developments in Parkinson's disease*. New York, Raven Press 1986 pp 103-113.

Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 1989; 341(6238): 149-152.

Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451-452.

Lesch KP, Gross J, Wolozin BL, Murphy, Riederer P. Extensive sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP+. *J. Neural Transm. (GenSect)* 1993; 93: 75-82.

Lin L FH, Doherty DH, Lile JD, Bektosh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-1132.

Lindner MD, Winn SR, Baetge EE y cols Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. *Exp. Neurol.* 1995; 132: 62-76.

Ling ZD, Potter DE, Lipton JW, Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp. Neurol.* 1998; 149(2): 411-423.

Liu L, Xu W, Harrington K y cols. The molecular cloning and expression of an human vesicle amine transporter that supresses MPP+ toxicity. *Mol. Brain Res.* 1994; 25: 90-96.

Liu X, Ernfors P, Wu H, Jaenisch R. Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 1995; 375(6528): 238-241.

Liuzzi A, Angeletti PU, Levi-Montalcini R Metabolic effects of a specific nerve growth factor (NGF) on sensory and sympathetic ganglia enhancement of lipid biosynthesis. *J. Neurochem.* 1965; 12(8): 705-708.

Lu X, Hagg T. Glial cell line-derived neurotrophic factor prevents death, but not reductions in tyrosine hydroxylase, of injured nigrostriatal neurons in adult rats. *J. Comp. Neurol.* 1997; 88(3): 484-494.

Lucidi-Phillipi CA, Gage FH, Shults CW, Jones KR, Reichardt LF, Kang UJ. Brain-derived neurotrophic factor-transduced fibroblasts: production of BDNF and effects of grafting to the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1995; 354(3): 361-376.

Luquin MR, Obeso JA, Herrero MT, Laguna J, Martinez-Lage JM. Parkinsonism induced by MPTP as an experimental model of Parkinson disease: similarities and differences. *Neurologia* 1991; 6(8): 287-294.

Luquin MR, Laguna J, Obeso JA. Selective D2 receptor stimulation induces dyskinesia in Parkinsonian monkeys. *Ann. Neurol.* 1992; 31: 551-554.

Luquin MR, Domínguez JJ, Del Río L, Zbarsky V, Guillén J. N-Acetyl-cysteine produces dopaminergic neuronal death induced by 6-OHDA. *Mov. Disord.* 1996; 11(Suppl): 144.

Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE. Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94(25): 14083-14088.

Manier M, Cristina N, Chatellard Causse C, Mouchet P, Herman JP, Feuerstein C. Striatal target-induced axonal branching of dopaminergic mesencephalic neurons in culture via diffusible factors. *J. Neurosci. Res.* 1997; 48(4): 358-371.

Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 1984; 311(5985): 464-467.

Martin Wr, Stoessl AJ, Adam MJ, Grierson JR, Ruth TJ, Pate BD, Calne DB. Imaging of dopamine systems in human subjects exposed to MPTP. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y IJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986. Pág 315-325.

Martin D, Miller G, Fischer N, Diz D, Cullen T, Russell D. Glial cell line-derived neurotrophic factor: the lateral cerebral ventricle as a site of administration for stimulation of the substantia nigra dopamine system in rats. *Eur. J. Neurosci.* 1996; 8(6): 1249-1255.

Martín Masso JF, Poza JJ. A new type of epidemiological study: questionnaire administered by medical personnel. *Neuroepidemiology* 1992; 11: 296-298.

Matsubara K, Idzu T, Kobayashi Y, Nakahara D, Maruyama W, Kobayashi S, Kimura K, Naoi M. N-methyl-4-phenylpyridinium and an endogenously formed analog, N-methylated beta-carbolinium, inhibit striatal tyrosine hydroxylation in freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 1995; 199(3): 199-202.

Matsuda S, Saito H, Nishiyama N. Effect of basic fibroblast growth factor on neurons cultured from various regions of postnatal rat brain. *Brain Res.* 1990; 520: 310-316.

Matsuda S, Saito H, Nishiyama N. Basic fibroblast growth factor ameliorates rotational behavior of substantia nigral-transplanted rats with lesions of the dopaminergic nigrostriatal neurons. *Jpn. J. Pharmacol.* 1992; 59(3): 365-370.

Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, y cols. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60: 588-596.

Matsushita N, Fujita Y, Tanaka M, Nagatsu T, Kiuchi K. Cloning and structural organization of the gene encoding the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF. *Gene* 1997; 203: 149-157.

Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Cyclosporin A attenuates degeneration of dopaminergic neurons induced by 6-hydroxydopamine in the mouse brain. *Brain Res.* 1996; 733:101-104.

Matzuk M, Saper C. Preservation of hypothalamic dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1985; 18: 552-555.

Mayer E, Dunnett S, Pellitteri R y cols. Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons. Effects in vitro. *Neuroscience* 1993; 56: 379-388.

McGeer EG, Singh EA, McGeer PL. Apparent anterograde transport of basic fibroblast growth factor in the rat nigrostriatal dopamine system. *Neurosci. Lett.* 1992; 48: 31-33.

Melamed E, Rosenthal J, Glous M, Cohen M, Uzzan A. Effect of pharmacological manipulation of dopamine metabolism on the dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice. En : MPTP : a neurotoxin producing a parkinsonian syndrome. Academic press, London, 1986. Editores: Markey SP, Castagnoli N, Trevor AJ. Pág 431-435.

Melega WP, Raleigh MJ, Stout DB, DeSalles AA, Cherry SR, Blurton-Jones M, Morton GG, Huang SC, Phelps ME. Longitudinal behavioral and 6-[18F]fluoro-L-DOPA-PET assessment in MPTP-hemiparkinsonian monkeys. *Exp. Neurol.* 1996; 141: 318-329.

Mena MA, Zorzano A, Herrera E. Acute effects of ethanol on brain, plasma and adrenal monoamine concentrations in virgin and pregnant rats and their fetuses. *Neurochem. Int.* 1986; 9: 371-378.

Mena MA, Garcia de Yebenes J, Dwork A, Fahn S, Latov N, Herbert J, Flaster E, Slonim D. Biochemical properties of monoamine-rich human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1989; 486(2): 286-296.

Mena MA, Pardo B, Paino CL, de Yebenes JG. L-DPA toxicity in foetal rat midbrain neurones in culture: modulation by ascorbic acid. *Neuro Report* 1993; 4: 438-440.

Mena MA, Casarejos MJ, Gimenez-Gallego G, Garcia de Yebenes J. Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons in vitro. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 1995; 9(1): 1-14.

Mena MA, Casarejos MJ, Carazo A, Paíno CL, G de Yébenes J. Glia conditioned medium protects fetal rat midbrain neurones in culture from L-DOPA toxicity. *NeuroReport* 1996; 7: 441-445.

Mena MA, Casarejos MJ, Carazo A, Paíno CL, G de Yébenes J. Glia protect fetal midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. *J. Neural. Transm.* 1997; 104: 317-328.

Michel PP, Ruberg M, Agid Y. Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. *J. Neurochem.* 1997; 69(4): 1499-1507.

Miyoshi Y, Zhang Z, Ovadia A, Lapchak PA, Collins F, Hilt D, Lebel C, Kryscio R, Gash DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor-levodopa interactions and reduction of side effects in parkinsonian monkeys. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 208-214.

Mitsumoto Y, Watanabe A, Mori A, Koga N. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 248(3): 660-663.

Mizuno Y, Saitoh T, Sone N. Inhibition of mitochondrial NADH-ubiquinone oxido reductase activity by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 143: 294-299.

Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa D. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 163: 1450-1455.

Mizuno Y, Suzuki K, Ohta S. Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 1990; 96: 49-57.

Mogi M, Harada M, Kiuchi K, Kojima K, Kondo T, Narabayashi H, Rausch D, Riederer P, Jellinger K, Nagatsu T. Homospecific activity (activity per enzyme protein) of tyrosine hydroxylase increases in parkinsonian brain. *J. Neural Transm.* 1988; 72(1): 77-82.

Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ. Regional changes in ^{18}F dopa metabolism in the striatum in Parkinson's disease. *Brain* 1997; 119: 2097-2103.

Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ. An ^{18}F -dopa PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 1996; 119: 585-591.

Mouradian MM, Heuser IJE, Baronti F. Pathogenesis of dyskinesias in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1989; 25: 523-526.

Moy LY, Albers DS, Sonsalla PK. Lowering ambient or core body temperature elevates striatal MPP⁺ levels and enhances toxicity to dopamine neurons in MPTP-treated mice. *Brain Res.* 1998; 790(1-2): 264-269.

Muller HW, Junghans U, Kappler J. Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. *Pharmacol. Ther.* 1995; 65: 1-18.

Murer MG, Dziewczapolski G, Menalles LB, García MC, Agid Y, Gershanik O, Raisman-Vozari R. Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 561-575.

Myllyla VV, Sotaniemi KA, Hakulinen P, Maki-Ikola O, Heinonen EH. Selegiline as the primary treatment of Parkinson's disease--a long-term double-blind study. *Acta Neurol. Scand.* 1997; 95(4): 211-218.

Mytilineou C, Cohen G, Heikkila RE. 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP+) is toxic to mesencephalic dopamine neurons in culture. *Neurosci. Lett.* 1985; 57: 19-24.

Nagata K, Takei N, Nakajima K, Saito H, Kohsaka S. Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neurosci. Res.* 1993; 34: 357-363.

Namura I, Douillet P, Sun CJ, Pert A, Cohen RM, Chiueh CC. MPP+ (1-Methyl-4-phenylpyridine) is a neurotoxin to dopamine-, norepinephrine- and serotonin-containing neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 136: 31-37.

Neystat M, Troy CM, de Vera M, Przedborski S. Effects of MPP+ on gene expression in PC12 cells. *Mov. Disord.* 1997; 12: 44.

Nicklas WJ, Vyas J, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by MPP+, a metabolite of the neurotoxin MPTP. *Life Sci.* 1985; 36: 2503-2508.

Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. MPT, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci.* 1987; 40: 721-729.

Nikkhah G, Odin P, Smits A, Tingstrom A, Othberg A, Brundin P y cols.
Platelet derived growth factor promotes survival of rat and human
mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Exp. Brain Res.* 1993; 92:
516-523.

Nistico G, Ciriolo MR, Fiskin K, Iannone M, De Martino A, Rotilio G.
NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase
and glutathione peroxidase activity in the brain of the aged rats. *Free radicals*
Biol. Med. 1992; 12: 177-181.

Norman AB, Norgren RB, Wyatt LM, Hildebrand JP, Sanberg PR. The
direction of apomorphine-induced rotation behaviour is dependent on the
location of excitotoxic lesions in the rat basal ganglia. *Brain Res.* 1992; 569:
169-172.

Oertel WH. Status of trophic factors for Parkinson's Disease. *Mov.*
Disord. 1998; 13 (suppl 2): M40.

Okazawa H, Murata M, Watanabe M, Kamei M, Kanazawa I.
Dopaminergic stimulation up-regulates the in vivo expression of
brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum. *FEBS Lett.* 1992;
313(2): 138-142.

Olanow CW. Deprenyl in the treatment of Parkinson's disease: clinical
effects and speculations on mechanism of action. *J. Neural. Transm.* 1996; 48:
75-84.

Olanow CW. Selegiline and neuroprotection -current status and prospects
for the future. *Mov. Disord.* 1997; 12:143.

O'Malley EK, Sieber BA, Black IB, Dreyfus CF. Mesencephalic type I
astrocytes mediate the survival of substantia nigra dopaminergic neurons in
culture. *Brain Res.* 1992; 582: 65-70.

O'Malley EK, Sieber BA, Morrison RS, Black IB, Dreyfus CF. Nigral type 1 astrocytes release a soluble factor that increase dopaminergic neurons survival through mechanisms distinct from basic fibroblast growth factor. *Brain Res.* 1994; 647: 83-90.

Ostergaard K, Schou JP, Gahwiler BH, Zimmer J. Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in organotypic slice cultures of the rat striatum and neocortex. *Exp. Brain Res.* 1991; 83(2): 357-365.

Ostergaard K, Jones SA, Hyman C, Zimmer J. Effects of donor age and brain-derived neurotrophic factor on the survival of dopaminergic neurons and axonal growth in postnatal rat nigrostriatal cocultures. *Exp. Neurol.* 1996; 142: 340-350.

Otto D, Unsicker K. Basic FGF reverses chemical and morphological deficits in the nigrostriatal system of MPTP-treated mice. *J. Neurosci.* 1990; 10: 1912-1921.

Otto D, Unsicker K. FGF-2 mediated protection of cultured mesencephalic dopaminergic neurons against MPTP and MPP⁺: specificity and impact of culture conditions, no dopaminergic neurons and astroglial cells. *J. Neurosci. Res.* 1993; 34: 382-393.

Otto D, Unsicker K. FGF-2 in the MPTP model of Parkinson's disease: effects on astroglial cells. *Glia* 1994; 11: 47-56.

Ovadia A, Zhang Z, Gash. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging* 1995; 16(6): 931-937.

Owen DB, Morley JS, Ensor DM, Allen YS, Miles JB. Trophic effects of melanotropin-potentiating factor (MPF) on cultures of cells of the central nervous system. *Peptides* 1997; 18(7): 1015-21.

Ozcelik T, Rosenthal A, Francke U. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse. *Genomics* 1991; 10(3): 569-575.

Page RD, Sambrook MA, Crossman AR. Thalamotomy for the alleviation of levodopa-induced dyskinesia: experimental studies in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated parkinsonian monkey. *Neuroscience* 1993; 55(1): 147-165.

Pardo B, Paíno CL, Casarejos MJ, Mena MA. Neuronal-enriched cultures from embryonic rat ventral mesencephalon for pharmacological studies of dopamine neurons. *Brain Res. Protocols* 1997; 1: 127-132.

Parisi JE, Burns S. The neuropathology of MPTP-induced parkinsonism in man and experimental animals. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Academic Press, London, 1986. Editores: Markey SP, Castagnoli N, Trevor AJ. Pág 141-148.

Park TH, Mytilineou C. Protection from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity and stimulation of regrowth of MPP+-damaged dopaminergic fibers by treatment of mesencephalic cultures with EGF and basic FGF. *Brain Res.* 1992; 599: 83-97.

Parkinson J. An essay on the shaking palsy. Neely y Jones, Sherwood, London, 1817.

Pate BD, Kawamata T, Yamada T, McGeer EG, Hewitt KA, Snow BJ, Ruth TJ, Calne DB. Correlation of striatal fluorodopa uptake in the MPTP monkey with dopaminergic indices. *Ann. Neurol.* 1993; 34(3): 331-338.

Paulus W, Jellinger K. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1991; 50: 743-755.

Pearce RKB, Collins P, Jenner P y cols. Intraventricular infusion of basic fibroblast growth factor (b-FGF) in the MPTP-treated common marmoset. *Synapse* 1996; 23: 192-200.

Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. A stereotaxic atlas of the rat brain. 1979 2ª edición. Plenum Press, New York.

Pérez-Otaño I, Herrero MT, Oset C, De Ceballos ML, Luquin MR, Obeso JA, Del Río J. Extensive loss of brain dopamine and serotonin induced by chronic administration of MPTP in the marmoset. *Brain Res.* 1991; 567: 127-132.

Pérez-Otaño I, Herrero MT, Luquin MR, Obeso JA, Del Río J. Chronic MPTP treatment reduces substance P and Met-enkephalin content in the basal ganglia of the marmoset. *Brain Res.* 1992; 585: 156-160.

Pérez-Otaño I, Oset C, Herrero MT, Luquin MR, Obeso JA, Del Río J. MPTP induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neurosci. Lett.* 1994; 175: 121-125.

Perlmuter JS, Tempel LW, Black KJ, Parkinson D, Todd RD MPTP induces dystonia and parkinsonism. Clues to the pathophysiology of dystonia. *Neurology* 1997; 49(5): 1432-1438.

Pezzoli G, Fahn S, Dwork A y cols. Non-chromaffin tissue plus nerve growth factor reduces experimental parkinsonism in aged rats. *Brain Research* 1988; 459: 398-403.

Pierret P, Quenneville N, Vandaele S, Abbaszadeh R, Lanctot C, Crine P, Doucet G. Trophic and trophic effects of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons and their axons. *J. Neurosci. Res.* 1998; 51(1): 23-40.

Piccini P, Morrish PK, Turjanski N y cols. Dopaminergic function in familial Parkinson's disease: a clinical and [18F]-dopa PET. *Ann. Neurol.* 1997; 41: 222-229.

Piccini P, Weeks RA, Brooks DJ. Opioid receptor binding in Parkinson's patients with and without levodopa-induced dyskinesias. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 720-726.

Piccini P, Burn DJ, Ceravolo R, Meragnore D, Brooks DJ. The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 577-582.

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382(6586): 73-76.

Pifl C, Bertel O, Schingnitz G, Hornykiewicz O. Striatal and non-striatal neurotransmitter changes in MPTP-parkinsonism in rhesus-monkeys: the symptomatic versus asymptomatic condition. *Neurochem. Int.* 1992; (Suppl 1): 295S-297S.

Pifl C, Giros B, Caron MG. Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurosci.* 1993; 13: 4246-4253.

Poirier J, Barbeau A. 1-Methyl-4-phenylpyridinium -induced inhibition of nicotinamide adenosine dinucleotide cytochrome c reductase. *Neurosci. Lett.* 1985; 62: 7-11.

Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, y cols. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274: 1197-1199.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.

Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini AB, Simonetti S, Fahn S y cols. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxido dismutase activity are resistant to N-Methyl-4-phenil-1,2,3,6-tetrahydropiridine induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 1992; 12: 1658-1667.

Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 1995; 67: 631-647.

Przedborski S, Khan U, King MP. Evidence of extramitochondrial deleterious effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Mov. Disord.* 1997; 12: 45.

Pycock CJ. Turning behaviour in animals. *Neuroscience* 1980; 5: 451-514.

Revuelta M, Romero-Ramos M, Venero JL, Millan F, Machado A, Cano J. Less induced 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity on striatal slices from guinea-pigs fed with a vitamin C-deficient diet. *Neuroscience* 1997; 77(1): 167-174.

Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermarck B, Dubois-Dalcq MA. Role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 1988; 53(2): 309-319.

Riederer P, Youdim MB. Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl. *J. Neurochem.* 1986; 46: 1359-1365.

Rosenblad C, Kirik D, Phillips HS, Bjorklund A. Repeated administration of Neurturin and GDNF protects nigral dopaminergic neurons from 6-OHDA induced cell death in vivo. *Mov. Disord.* 1998a; 13(suppl2): P2.221.

Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 1998b; 82: 129-137.

Rothblat DS, Schneider JS. The effects of L-deprenyl treatment, alone and combined with GM1 ganglioside, on striatal dopamine content and substantia nigra pars compacta neurons. *Brain Res.* 1998; 779: 226-230.

Rufer M, Wirth SB, Hofer A, Dermietzel R, Pastor A, Kettenmann H, Unsicker K. Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* 1996; 46: 606-617.

Rydel RE, Greene LA. Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J. Neurosci.* 1987; 7(11): 3639-3653.

Salach JJ, Singer TP, Castagnoli N Jr, Trevor A. Oxidation of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 125(2): 831-835.

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382(6586): 70-73.

Sauer H, Rosenblad C, Bjorklund A. Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 8935-8939.

Sawada H, Shimohama S, Tamura Y, Kawamura T, Akaike A, Kimura J. Methylphenylpyridium ion (MPP+) enhances glutamate-induced cytotoxicity against dopaminergic neurons in cultured rat mesencephalon. *J. Neurosci. Res.* 1996; 43: 55-62.

Scarisbrick IA, Jones EG, Isackson PJ. Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. *J. Neurosci.* 1993; 13(3): 875-893.

Schaar DG, Sieber BA, Sherwood AC, Dean D, Mendoza G, Ramakrishnan L, Dreyfus CF, Black IB. Multiple astrocyte transcripts encode nigral trophic factors in rat and human. *Exp. Neurol.* 1994; 130: 387-393.

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1: 126.

Schneider JS, Dacko S. Relative sparing of the dopaminergic innervation of the globus pallidus in monkeys made hemi-parkinsonian by intracarotid MPTP infusion. *Brain Res.* 1991, 556(2): 292-296.

Schneider JS, DiStefano L. Enhanced restoration of striatal dopamine concentrations by combined GM1 ganglioside and neurotrophic factor treatments. *Brain Res.* 1995; 674(2): 260-264.

Schneider JS, Lidsky TI, Hawks T, Mazziotta JC, Hoffman JM. Differential recovery of volitional motor function, lateralized cognitive function, dopamine agonist-induced rotation and dopaminergic parameters in monkeys made hemi-parkinsonian by intracarotid MPTP infusion. *Brain Res.* 1995; 672(1-2): 112-117.

Schulz JB, Henshaw DR, Matthews RT, Beal MF. Coenzyme Q10 and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol.* 132: 279-283, 1995.

Seroogy KB, Gall CM. Expression of neurotrophins by midbrain dopaminergic neurons. *Exp. Neurol.* 1993; 124(1): 119-128.

Serrano-Sanchez T, Diaz-Armesto I. Brain-derived growth factor: current aspects. *Rev. Neurol.* 1998; 26(154): 1027-1032.

Shen RS, Abell CW, Gessner W, Brossi A. Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP⁺. *FEBS Lett.* 1985; 189: 225-230.

Shults CW, Kimber T, Altar CA. BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* 1995; 6(8): 1109-1112.

Shults CW, Kimber T, Martin D. Intrastriatal injection of GDNF attenuates the effects of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* 1996; 7: 627-631.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ y cols. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.* 1994; 36: 348-355.

Sieber-Blum M, Ito K, Richardson MK, Langtimm CJ, Duff RS. Distribution of pluripotent neural crest cells in the embryo and the role of brain-derived neurotrophic factor in the commitment to the primary sensor neuron lineage. *J. Neurobiol.* 1993; 24(2): 173-184.

Silos-Santiago I, Greenlund LJS, Johnson EM y cols. Molecular genetics of neuronal survival. *Curr. Opi. Neurobiol.* 1995; 5: 42-49.

Sirinathsinghji DJS, Heavens RP, Richards SJ, Beresford IJM, Hall MD. Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway -I. Behavioural, neurochemical and histological characterization of the lesion. *Neurosci.* 1988; 27: 117-128.

Slivka IA, Mytilineou CC, Cohen G. Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain Res.* 1987; 409: 275-284.

Sneider JS. Levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys: relationship to extent of nigrostriatal damage. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989; 34: 193-196.

Snow BJ, Tooyama I, Mc Geer EG y cols. Human positron emission tomographic [¹⁸F]fluorodopa studies correlate with dopamine cell counts and levels. *Ann. Neurol.* 1993; 34: 324-330.

Snyder EY. Grafting immortalized neurons to the CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994; 4(5): 742-751.

Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 1991; 56: 978-982.

Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, y cols. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 1991; 65(5): 895-903.

Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 1987; 237(4814): 517-522.

Spina MB, Squinto SP, Miller J, Lindsay RM, Hyman C. Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J. Neurochem.* 1992; 59: 99-106.

Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, y cols. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 1991; 65(5): 885-893.

Steinert JP, Connolly MA, Valentine HL, Hamilton GS, Dawson TM, Hester L and Snyder SH. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat. Med.* 1997a; 3: 421-428.

Steinert JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Connolly MA, Liang S y cols. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997b; 94: 2019-2024.

Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heuman R y cols. Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin and various growth factors in astrocyte culture and in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 1990; 2: 69-76.

Storey E, Hyman BT, Jenkins B, Brouillet E, Miller JM, Rosen BR, Beal MF. 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J. Neurochem.* 1992; 58: 1975-1978.

Subramanian T, Emerich DF, Bakay RA, Hoffman JM, Goodman MM, Shoup TM, Miller GW, Levey AI, Hubert GW, Batchelor S, Winn SR, Saydoff JA, Watts RL. Polymer-encapsulated PC-12 cells demonstrate high-affinity uptake of dopamine in vitro and 18F-Dopa uptake and metabolism after intracerebral implantation in nonhuman primates. *Cell Transplant.* 1997; 6(5): 469-477.

Sullivan AM, Opacka Juffry J, Hotten G, Pohl J, Blunt SB. Growth/differentiation factor 5 protects nigrostriatal dopaminergic neurones in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; 233: 73-76.

Sullivan AM, Pohl J, Blunt SB. Growth/differentiation factor 5 and glial cell line-derived neurotrophic factor enhance survival and function of dopaminergic grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10(12): 3681-3688.

Sun CJ, Johannessen JN, Gessner W, Namura I, Singhaniyom W, Brossi A, Chiueh CC. Neurotoxic damage to the nigrostriatal system in rats following intranigral administration of MPDP+ and MPP+. *J. Neural Transm.* 1988; 74: 75-86.

Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmiol S, Dunnett SB. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 1997; 148: 135-146.

Takada M, Campbell KJ, Hattori T. Regional localization of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) uptake: mismatch between its uptake and neurotoxic sites. *Neurosci. Lett.* 1991; 133: 137-140.

Takayama H, Ray J, Raymon HK y cols. Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nature Med.* 1995; 153: 58.

Takeda A, Mallory M, Sundsmo M, Honer W, Hansen L, Masliah E. Abnormal accumulation of NACP/alpha- synuclein in neurodegenerative disorders. *Am. J. Pathol.* 1998; 152: 367-372.

Takeshima T, Shimoda K, Sauve Y, Commissiong JN. Astrocyte-dependent and independent phases of the development and survival of rat embryonic day 14 mesencephalic neurons in culture. *Neuroscience* 1994a; 60: 809-823.

Takeshima T, Jhonston JM, Commissiong JW. Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O2A) progenitors increase the survival of rat mesencephalic dopaminergic neurons from death induced by serum deprivation. *Neurosci. Lett.* 1994b; 166: 178-182.

Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 1990; 40(10 Suppl 3): suppl 17-30.

Tanner CM, Hubble JP, Chan P. Epidemiology and genetics of Parkinson's disease. En: RL Watts y WC Koller. *Movement Disorders*. New York: Mc Graw-Hill, pp.137-1652, 1997.

Tanner CM, Ben-Shlomo Y. Epidemiology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 1999; 80: 153-159.

Tatton WG, Chalmers-Redman RM. Modulation of gene expression rather than monoamine oxidase inhibition: (-)-deprenyl-related compounds in controlling neurodegeneration. *Neurology* 1996; 47(6 Suppl 3): S171-83.

Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Ju WY, Wadia J, Tatton NA. Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription. *J. Neural. Transm. Suppl.* 1997; 49: 245-268.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.

Tolkovsky A. Neurotrophic factors in action- new dogs and new tricks. TINS 1997; 20 (1): 1-2.

Tomac A, Lindqvist E, Lin LF y cols. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. Nature 1995; 373(6512): 335-339.

Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, y cols. Retrograde axonal transport of glial cell line derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1995; 92: 8274-8278.

Tooyama I, Walker D, Yamada T, Hanai K, Kimura H, McGeer EG, McGeer PL. High molecular weight basic fibroblast growth factor-like protein is localized to a subpopulation of mesencephalic dopaminergic neurons in the rat brain. Brain Res. 1992; 593: 274-280.

Tooyama I, Kawamata T, Walker D y cols. Loss of basic fibroblast growth factor in substantia nigra neurons in Parkinson's disease. Neurology 1993; 43: 372-376.

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. Nature 1996; 382(6586): 80-83.

Tretiakoff C. Contribution a l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives à la pathogenie de troubles du tonus musculaire et de la maladie du Parkinson. Thesis, University of Paris, 1919.

Trevor AJ, Ciba K, Yu Y, Caldera PS, Castagnoli KP, Peterson LA y cols. Metabolism of MPTP in vitro: The intermediate role of 2,3-MPDP+ and studies on its chemical and biochemical reactivity. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y IJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986.

Trimmer PA, Smith TS, Jung AB, Bennett JP Jr. Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. *Neurodegeneration* 1996; 5(3): 233-239.

Tseng JL, Baetge EE, Zurn AD, Aebischer P. GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. *J. Neurosci.* 1997; 17(1): 325-333.

Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery* 1995; 37(4): 733-739.

Turski L, Bressler K, Retting KJ, Lösachmann PA, Wachtel H. Protection of substantia nigra neurons from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 1991; 349: 414-418.

Uhl GR, Javitch JA, Snyder SH. Normal MPTP binding in parkinsonian substantia nigra: evidence for extraneuronal toxin conversion in human brain. *Lancet* 1985; 1: 956-957.

Uhl GR, Walther D, Mash D y cols. Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann. Neurol.* 1994; 35: 494-498.

Uhl GR. Hypothesis: The role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 555-560.

Ungerstedt U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 1968; 5: 107-110.

Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1971a; 367: 69-93.

Ungerstedt U. Adipsia and aphagia after 6-OHDA induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 1971b(Suppl 367): 95-122.

Ungerstedt U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1971c; 367: 49-68.

Vaccarino FM, Schwartz ML, Hartigan D, Leckman JF . Basic fibroblast growth factor increases the number of excitatory neurons containing glutamate in the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 1995; 54: 64-78.

Ventrella LL. Effect of intracerebroventricular infusion of epidermal growth factor in rats hemitranssected in the nigrostriatal pathway. *J. Neurosurg. Sci.* 1993; 37: 1-8.

Vingerhoets FGF, Snow BJ, Tetud JW, Langston JW, Schulzer M, Calne DB. Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. *Ann. Neurol.* 1994; 36: 765-770.

Wanaka A, Johnson EM, Milbrandt J. Localization of FGF receptor mRNA in the adult rat central nervous system by in situ hybridization. *Neuron* 1990; 5: 267-281.

Waters CM, Hunt SP, Jenner P, Marsden CD. An immunohistological study of the acute and long-term effects of MPTP in the marmoset. *Neuroscience* 1987; 23: 1025-1039.

Winkler J, Ramirez GA, Kuhn HG, Peterson DA, Day-Lollini PA, Stewart GR, Tuszynski MH, Gage FH, Thal LJ. Reversible Schwann cell hyperplasia and sprouting of sensory and sympathetic neurites after intraventricular administration of nerve growth factor. *Ann. Neurol.* 1997; 41(1): 82-93.

Wolfson LI, Leenders KL, Brown LL, Jones T. Alterations of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in Parkinson's disease. *Neurology* 1985; 35(10): 1399-1405.

Yan Q, Matheson C, Lopez OT. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 1995; 373(6512): 341-344.

Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ y cols. Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behaviorally improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1995; 11: 25-36.

Youdim MBH, Riederer P. MAO type B: its relation to MPTP-induced and classical parkinsonism. En: MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. SP Markey, N Castagnoli, AJ Trevor, y IJ Kopin ed. Academic press, Inc, London, England, 1986.

Yurek DM, Lu W, Hipkens S y cols. BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Exp. Neurol.* 1996; 137: 105-118.

Zawada WM, Kirschman DL, Cohen JJ, Heidenreich KA, Freed CR. Growth factors rescue embryonic dopamine neurons from programmed cell death. *Exp. Neurol.* 1996; 140(1): 60-67.

Zeng BY, Jenner P, Marsden CD. Altered motor function and graft survival produced by basic fibroblast growth factor in rats with 6-OHDA lesions and fetal ventral mesencephalic grafts are associated with glial proliferation. *Exp. Neurol.* 1996; 139(2): 214-226.

Zhang Z, Miyoshi Y, Lapchak PA, Collins F, Hilt D, Lebel C, Kryscio R, Gash DM. Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997 Sep; 282(3): 1396-1401.

Zhong XH, Haycock JW, Shannak K, Robitaille Y, Fratkin J, Koeppen AH, Hornykiewicz O, Kish SJ. Striatal dihydroxyphenylalanine decarboxylase and tyrosine hydroxylase protein in idiopathic Parkinson's disease and dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy. *Mov. Disord.* 1995 Jan; 10(1): 10-7.